

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:
DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA DO FÁRMACO ROLIPRAM
UTILIZANDO FASE ESTACIONÁRIA *O,O'*-BIS[4-*TERC*-
BUTILBENZOIL]-*N,N'*-DIALIL-L-TARTARDIAMIDA

Autor: João Paulo Sartor

Orientador: Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Campinas – São Paulo

Julho de 2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

Sa77s Sartor, João Paulo
Separação cromatográfica do fármaco rolipram utilizando fase estacionária *O,O'*-bis[4-*terc*-butilbenzoil]-*N,N'*-dialil-L-tartardiamida / João Paulo Sartor.--Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Cesar Costapinto Santana
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Adsorção. 2. Cromatografia líquida de alta eficiência. 3. Enantiômeros. 4. Quiralidade. I. Santana, Cesar Costapinto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Titulo em Inglês: Chromatographic separation of rolipram using *O,O'*-bis[4-*tert*-butylbenzoyl]-*N,N'*-diallyl-L-tartardiamide

Palavras-chave em Inglês: Adsorption, High performance liquid chromatography, Enantiomers, Chirality.

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos.

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Cesar Costapinto Santana, Marco Aurélio Cremasco e Pierina Sueli Bonato.

Data da defesa: 31/07/2006

Dissertação de Mestrado defendida por João Paulo Sartor e aprovada em 31 de julho de 2006 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana (Orientador)

Prof. Dr. Marco Aurélio Cremasco

Profa. Dra. Pierina Sueli Bonato

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química.

Cesar Costapinto Santana

A meu pai Antônio e
minha mãe Alvira, ...

minhas irmãs Elaine,
Eliane e Leonice ...

e todos meus
amigos.

Agradecimentos

À Deus, pela base de toda existência.

Aos meus queridos pais Antônio e Alvira, pela educação, amizade e principalmente estrutura familiar.

Minhas maravilhosas irmãs Elaine, Eliane e Leonice que, com suas famílias, sempre me apoiaram e me deram forças nos desafios.

Ao professor Cesar Santana pela orientação e confiança.

À Unicamp, em especial ao Departamento de Processos Biotecnológicos, pela oportunidade dada de realizar este trabalho.

À FAPESP pelo suporte financeiro dado ao projeto e pela bolsa de mestrado.

Ao professor Carlos Roque do Instituto de Química por ceder parte do rolipram utilizado nos experimentos e o laboratório em algumas etapas experimentais.

À professora Sônia por disponibilizar o equipamento de cromatografia e o laboratório.

Aos colegas de laboratório: Ivanildo pela ajuda, principalmente na etapa inicial do trabalho; suas dicas foram fundamentais no decorrer dos experimentos. Amaro pela grande força no final do trabalho com a simulação dos dados; seu apoio foi primordial para o desenrolar da dissertação. Vinicius pela sua disponibilização em auxiliar no sistema LMS. Alessandra, Raquel e Marco pelo companheirismo. A todos estes agradeço ainda pelos momentos de descontração e bate papo.

Aos colegas do LimBio pelos churrascos e pelas conversas.

Aos amigos de Maringá que mantiveram firmes os laços criados ainda na graduação.

A minha querida namorada Sílvia, pelo carinho e amor. Seu apoio, sua compreensão e sua presença constante em todos os momentos me mantiveram firme na busca dos ideais.

Ao amigo Mike e sua família pelo fortalecimento pessoal.

À turma do tênis que todos os finais de semana me proporcionaram grandes momentos de amizade, lazer e companheirismo.

Aos colegas de república, receptivos e sempre dispostos a ajudar.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho de pesquisa e para meu amadurecimento pessoal e profissional, meus sinceros agradecimentos.

Sabe, pois, que assim será a sabedoria para tua alma.
Se tu a encontrares, haverá para ti um bom futuro
e tua esperança não será frustrada.

Provérbios 24,14

Resumo

O rolipram é um fármaco que possui ação inibidora sobre uma enzima relacionada a processos inflamatórios e tem demonstrado atividade antidepressiva. Ele é comercializado na forma racêmica, isto é, na proporção 1:1 dos seus enantiômeros *R* e *S*. No entanto, testes clínicos indicam que o enantiômero *R* apresenta maior potencial biológico que o enantiômero *S*. Sendo assim, a separação dos enantiômeros é importante para testes biológicos comparativos de efeitos colaterais. Inserindo-se neste contexto, foi desenvolvido este trabalho de pesquisa com o intuito de estudar a separação deste fármaco pela técnica de cromatografia líquida utilizando coluna empacotada com fase estacionária quiral. Foram determinados os parâmetros analíticos de separação e os dados de equilíbrio e transferência de massa em diferentes condições experimentais. Os resultados mostraram alta eficiência, com número de pratos superando 9000 e fatores de separação na ordem de 1,40. Valores de k_m superiores a 220 min^{-1} revelaram baixo efeito dos fenômenos de transferência de massa e conseqüente predomínio dos efeitos termodinâmicos, em destaque à energia entálpica (próxima a -10 kJ/mol para os enantiômeros). Para concentração da mistura até $3,00 \text{ mg/mL}$ as isotermas mostraram equilíbrio de adsorção com comportamento linear. Oito colunas cromatográficas foram posteriormente caracterizadas e, a partir dos seus parâmetros analíticos, determinaram-se regiões de separação dos enantiômeros para um sistema cromatográfico contínuo do tipo Leito Móvel Simulado, atendendo diferentes critérios de pureza. Com isso, avaliaram-se as variáveis de desempenho na região de mais alta pureza e o melhor resultado foi simulado a partir de um modelo transiente. Isso possibilitou a determinação do perfil transiente de eluição das correntes de saída e do perfil interno da unidade. As purezas alcançadas para as correntes de extrato e refinado foram $99,99\%$ e $96,74\%$, respectivamente.

Palavras-chave: rolipram, cromatografia quiral, separação de enantiômeros, Leito Móvel Simulado.

Abstract

Rolipram is an enzyme inhibiting anti-inflammatory drug which has also demonstrated antidepressant activity. It is marketed in the racemic form, that is, proportion 1:1 of their *R* and *S*-enantiomers. However, clinical tests indicate that the *R*-enantiomer presents a greater biological potential than *S*-enantiomer. For this reason their separation is important for comparative biological tests of collateral effects. It is in this context that this research was developed in order to studying the separation of this drug via liquid chromatography using columns packed with chiral stationary phase. Analytical separation parameters, equilibrium and mass transfer data were determined in different experimental conditions. The results revealed high efficiency, with number of plates overcoming 9000 and selectivities in the order of 1.40 for both enantiomers. k_m values higher than 220 min^{-1} demonstrated low effect of mass transfer rates and consequently a prevalence of thermodynamic effects; in particular enthalpy energy (next to -10 kJ/mol for both enantiomers). For mixture concentration up to 3.00 mg/mL the isotherms showed adsorption equilibrium with lineal behavior. Next eight chromatographic columns were characterized. Starting with their analytic parameters, the separation regions of the enantiomers were determined for a chromatographic continuous system like Simulated Moving-Bed, with respect to different purity criteria. With that, the performance parameters were evaluated in the highest region of purity and the best result was simulated using a transient model. This permitted the determination of the transient profile of elution in the exit lines and the internal profile of the unit. The purities reached for the extract and raffinate lines were 99.99% and 96.74% , respectively.

Keywords: rolipram, chiral chromatography, enantiomers separation, Simulated Moving-Bed.

Sumário

LISTA DE FIGURAS	xv
LISTA DE TABELAS	xviii
NOMENCLATURA	xix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. COLOCAÇÃO DO PROBLEMA	1
1.2. MOTIVAÇÃO PARA O TRABALHO	3
1.3. OBJETIVOS	4
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
2.1. O ROLIPRAM	6
2.2. ENANTIÔMEROS DE FÁRMACOS QUIRAIS	7
2.3. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA QUIRAL	8
2.4. FASE ESTACIONÁRIA QUIRAL	10
2.5. CROMATOGRAFIA LINEAR E NÃO-LINEAR	12
2.6. MÉTODO DOS MOMENTOS	13
2.7. ALTURA EQUIVALENTE A UM PRATO	15
2.8. ANÁLISE TERMODINÂMICA NA ADSORÇÃO	19
2.9. ISOTERMAS DE ADSORÇÃO	20
2.10. DETERMINAÇÃO DAS ISOTERMAS DE ADSORÇÃO	21
2.10.1. Métodos estáticos	21
Método batelada	21
Método adsorção-dessorção	23

2.10.2. Métodos dinâmicos	23
<i>Análise frontal</i>	23
<i>Método da perturbação</i>	25
<i>Eluição por pontos característicos</i>	27
<i>Método do tempo de retenção</i>	28
2.11. MODELOS DE ISOTERMAS DE ADSORÇÃO	29
2.11.1. <i>Modelo linear</i>	29
2.11.2. <i>Modelo de Langmuir competitivo</i>	29
2.11.3. <i>Modelo bi-Langmuir competitivo</i>	30
2.12. CONDIÇÕES DE SOBRECARGA NA COLUNA	31
2.13. CROMATOGRAFIA PREPARATIVA EM BATELADA	31
2.14. CROMATOGRAFIA PREPARATIVA EM LEITO MÓVEL SIMULADO	32
2.14.1. <i>Projetos das condições de operação do LMS</i>	36
2.14.2. <i>Modelagem matemática para o LMS</i>	43
2.14.3. <i>Modelagem matemática para o LMV</i>	44
2.14.4. <i>Variáveis de desempenho</i>	47
3. MATERIAIS E MÉTODOS	48
3.1. MATERIAIS	48
3.1.1. <i>O rolipram</i>	48
3.1.2. <i>Fase estacionária quirál</i>	49
3.1.3. <i>Aparelhagem experimental</i>	49
3.1.4. <i>Solventes</i>	49
3.2. MÉTODOS	50
3.2.1. <i>Experimentos preliminares</i>	50
<i>Definição e otimização da fase móvel</i>	50

<i>Avaliação da resposta do sistema de detecção</i>	50
<i>Determinação da ordem de eluição</i>	50
3.2.2. Experimentos com soluções diluídas	51
<i>Determinação da porosidade total</i>	51
<i>Determinação da porosidade do leito e da partícula</i>	52
<i>Determinação das constantes de equilíbrio de adsorção</i>	53
<i>Determinação das constantes de Henry e parâmetros analíticos de separação</i>	53
<i>Caracterização das colunas cromatográficas do sistema LMS</i>	55
3.2.3. Experimentos com soluções concentradas	55
<i>Estudo de sobrecarga da coluna</i>	55
<i>Determinação das isotermas de adsorção lineares pelo método da análise frontal</i>	56
<i>Separação dos enantiômeros em batelada</i>	56
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	58
4.1. DEFINIÇÃO E OTIMIZAÇÃO DA FASE MÓVEL	58
4.2. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DO SISTEMA DE DETECÇÃO	62
4.3. ORDEM DE ELUIÇÃO	63
4.4. EXPERIMENTOS COM SOLUÇÕES DILUÍDAS	65
4.4.1. Parâmetros analíticos de separação	65
4.4.2. Determinação das porosidades do sistema e constantes de Henry	70
4.4.3. Determinação dos constantes de equilíbrio de adsorção	72
4.4.4. Eficiência de separação e coeficientes de transferência de massa	74
4.4.5. Análise termodinâmica	78
4.5. EXPERIMENTOS COM SOLUÇÕES CONCENTRADAS	80
4.5.1. Variação da concentração de alimentação	80
4.5.2. Isotermas de adsorção	82

4.6. SEPARAÇÃO DOS ENANTIÔMEROS	87
4.6.1. Separação em batelada	87
4.6.2. Estudo preliminar visando a separação contínua em Leito Móvel Simulado	89
<i>Caracterização das colunas cromatográficas</i>	89
<i>Determinação da região de separação</i>	91
<i>Análise das variáveis de desempenho na região de separação</i>	93
<i>Determinação das vazões</i>	96
<i>Avaliação da separação contínua</i>	97
5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	101
5.1. CONCLUSÕES	101
5.2. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	102
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104

Lista de Figuras

Figura 1.1. Distribuição de medicamentos em desenvolvimento no mundo. _____	2
Figura 2.1. Estrutura molecular do rolipram. _____	7
Figura 2.2. Seqüência reacional para produção do polímero quiral a ser ligado à sílica para formar a fase estacionária quiral. _____	10
Figura 2.3. Estrutura da fase estacionária baseada no seletor quiral TBB. _____	11
Figura 2.4. Partículas da sílica Kromasil utilizadas nas colunas Kromasil® CHI-TBB. _____	11
Figura 2.5. Variação de H com u_0 , de acordo com a equação de van Deemter. _____	18
Figura 2.6. Método batelada para determinação de isoterma para um único soluto. _____	22
Figura 2.7. Curva de ruptura para uma mistura binária com as indicações dos volumes de retenção e das concentrações nos estágios de equilíbrio. _____	24
Figura 2.8. Esquema das quatro seções de uma unidade Leito Móvel Verdadeiro (LMV) em uma separação binária. _____	34
Figura 2.9. Esquema das quatro seções de uma unidade Leito Móvel Simulado (LMS) de configuração 2-2-2-2 para separação contínua. _____	35
Figura 2.10. Regiões do plano (m_{II} , m_{III}) com diferentes regimes de separação em termos da pureza das correntes de saída, para um sistema descrito por uma isoterma de adsorção linear. _____	41
Figura 2.11. Região de completa separação para uma mistura binária descrita por uma isoterma de adsorção multicomponente. _____	42
Figura 3.1. Estrutura molecular do composto inerte 1,3,5-tri- <i>terc</i> -butilbenzeno (TTBB). _____	51
Figura 3.2. Estrutura molecular do composto inerte poliestireno. _____	52
Figura 3.3. Representação de um perfil de eluição indicando o tempo de retenção (t_R), 10% e 50% da altura do pico. _____	55
Figura 4.1. Cromatograma da separação dos enantiômeros do rolipram. Fase Móvel: MTBE, $Q = 2,00$ mL/min e $\lambda = 270$ nm. _____	60
Figura 4.2. Cromatograma da separação dos enantiômeros do rolipram. Fase Móvel: MTBE/EtOAc (70/30, v/v), $Q = 2,00$ mL/min e $\lambda = 270$ nm. _____	60

Figura 4.3. Cromatograma da separação dos enantiômeros do rolipram. Fase Móvel: MTBE/EtOAc/2-Propanol (60/30/10, v/v), $Q = 2,00$ mL/min e $\lambda = 270$ nm. _____	61
Figura 4.4. Cromatograma da separação dos enantiômeros do rolipram. Fase Móvel: MTBE/EtOAc/etanol (60/35/5, v/v), $Q = 2,00$ mL/min e $\lambda = 270$ nm. _____	61
Figura 4.5. Varredura em espectrofotômetro UV-VIS para a mistura enantiomérica do rolipram em concentração 0,15 mg/mL. _____	63
Figura 4.6. Ordem de eluição dos enantiômeros do rolipram. $c_{amostra} = 0,15$ mg/mL, $Q = 2,00$ mL/min e $\lambda = 270$ nm. _____	64
Figura 4.7. Perfil de eluição do composto inerte TTBB. $c_{TTBB} = 1,50$ mg/mL, $Q = 2,00$ mL/min e $\lambda = 270$ nm. _____	66
Figura 4.8. Perfil de eluição dos enantiômeros. $c_{mistura} = 0,15$ mg/mL, $Q = 2,00$ mL/min e $\lambda = 270$ nm. _____	66
Figura 4.9. Variação da resolução na separação dos enantiômeros com a vazão, para as temperaturas: (\diamond) 25°C; (\square) 30°C; (Δ) 35°C e (\circ) 45°C. $c_{mistura} = 0,15$ mg/mL, $V_{inj} = 20$ μ L e $\lambda = 270$ nm. _____	68
Figura 4.10. Variação do tempo de retenção com a temperatura. _____	68
Figura 4.11. Perfis de eluição da mistura enantiomérica. _____	69
Figura 4.12. Variação das constantes de Henry para diferentes temperaturas. _____	71
Figura 4.13. Primeiro momento para o composto inerte poliestireno a 25°C. _____	72
Figura 4.14. Análise do primeiro momento para determinação das constantes de equilíbrio de adsorção para os enantiômeros. _____	73
Figura 4.15. Gráfico de van Deemter para o enantiômero <i>R</i> -(-)-rolipram em diferentes temperaturas. _____	75
Figura 4.16. Gráfico de van Deemter para o enantiômero <i>S</i> -(+)-rolipram em diferentes temperaturas. _____	76
Figura 4.17. Dependência do fator de retenção dos enantiômeros do rolipram com a temperatura. _____	78
Figura 4.18. Dependência do fator de separação dos enantiômeros do rolipram com a temperatura. _____	79
Figura 4.19. Perfis de eluição da mistura enantiomérica para diferentes concentrações de alimentação. _____	81
Figura 4.20. Variação do fator de assimetria com o aumento da concentração injetada. _____	82

Figura 4.21. Curva de ruptura para a mistura racêmica do rolipram para $c_{\text{mistura}} = 2,00$ mg/mL, $Q = 2,00$ mL/min e $\lambda = 254$ nm. _____	83
Figura 4.22. Análise de coletas realizadas durante a eluição dos enantiômeros. $c_{\text{mistura}} = 2,00$ mg/mL, $Q = 2,00$ mL/min e $\lambda = 270$ nm. _____	84
Figura 4.23. Perfis de eluição das 7 coletas da frente de adsorção durante a eluição dos enantiômeros do rolipram. $Q = 2,00$ mL/min e $\lambda = 270$ nm. _____	85
Figura 4.24. Isotermas de adsorção dos enantiômeros do rolipram em fase estacionária Kromasil [®] CHI-TBB a 25°C e $Q = 2,00$ mL/min obtidas pelo método da análise frontal. ____	86
Figura 4.25. Perfil de eluição dos enantiômeros do rolipram na separação em batelada e representação das regiões de coleta de cada fração. $c_{\text{mistura}} = 8,0$ g/L, $Q = 1,00$ mL/min, $\lambda = 270$ nm e $T = 25^\circ\text{C}$. _____	88
Figura 4.26. Perfis de eluição dos enantiômeros resultantes das análises correspondentes à: (a) Coleta 1 e (b) Coleta 2. $Q = 1,00$ mL/min, $\lambda = 270$ nm e $T = 25^\circ\text{C}$. _____	89
Figura 4.27. Regiões de separação dos enantiômeros no plano (m_{II} , m_{III}) de acordo com a Teoria do Equilíbrio. _____	93
Figura 4.28. Produtividade e consumo de solvente como função da diferença ($m_{\text{III}} - m_{\text{II}}$). ____	95
Figura 4.29. Perfil de eluição dos enantiômeros do rolipram nas correntes de extrato e refinado. _____	98
Figura 4.30. Perfil interno para diferentes ciclos. _____	99
Figura 4.31. Perfil interno da unidade no ciclo 10. _____	99

Lista de Tabelas

Tabela 2.1. Parâmetros adimensionais do modelo. _____	47
Tabela 2.2. Variáveis desempenho avaliadas no processo. _____	47
Tabela 4.1. Propriedades dos solventes a serem utilizados na fase móvel. _____	62
Tabela 4.2. Parâmetros analíticos de separação dos enantiômeros do rolipram em diferentes vazões de fase móvel. _____	67
Tabela 4.3. Efeito da temperatura nos parâmetros analíticos de separação. $Q = 2,00$ mL/min, $c_{\text{mistura}} = 0,15$ mg/mL e $\lambda = 270$ nm. _____	69
Tabela 4.4. Valores de porosidade total em diferentes vazões e temperaturas. _____	70
Tabela 4.5. Valores das constantes de equilíbrio de adsorção para os enantiômeros do rolipram em diferentes temperaturas. _____	74
Tabela 4.6. Número de pratos em diferentes vazões e temperaturas. _____	75
Tabela 4.7. Parâmetros A e C da equação de van Deemter para o enantiômero mais e menos retido do rolipram. _____	76
Tabela 4.8. Coeficientes de dispersão axial e de transferência de massa global para os enantiômeros do rolipram. _____	77
Tabela 4.9. Parâmetros termodinâmicos para os enantiômeros do rolipram. _____	79
Tabela 4.10. Coeficientes angulares e coeficientes de correlação das isothermas lineares dos enantiômeros do rolipram. _____	87
Tabela 4.11. Parâmetros analíticos dos enantiômeros alcançados na separação em batelada. _____	88
Tabela 4.12. Valores de porosidade total para as oito colunas e os tempos de retenção dos enantiômeros e do composto inerte TTBB. _____	90
Tabela 4.13. Resultados alcançados nas oito colunas para os fatores de capacidade e constantes de Henry para cada enantiômero e seletividade do sistema. _____	91
Tabela 4.14. Variáveis desempenho para as condições escolhidas na região de separação correspondente a 98,5% de pureza. _____	94
Tabela 4.15. Valores de tempo de troca, parâmetros m_j e vazões nas seções para a condição b . _____	96
Tabela 4.16. Vazões nas correntes de alimentação e saídas da unidade LMS. _____	96

Nomenclatura

a	Medida da banda esquerda do pico a 10% da altura (cm)
A	Coefficiente da equação de van Deemter
As_i	Fator de assimetria do componente i
b	Medida da banda direita do pico a 10% da altura (cm)
b_i	Constante de associação do componente i (mL/mg)
$b_{i,ns}$	Constante de associação para os sítios não seletivos (mL/mg)
$b_{i,s}$	Constante de associação para os sítios enantiosseletivos (mL/mg)
B	Coefficiente da equação de van Deemter
c_i	Concentração do componente i na fase líquida (mg/mL)
$c_{i,a}$	Concentração do componente i na alimentação da coluna (mg/mL)
$c_{i,b}$	Concentração do componente i na segunda frente de adsorção (mg/mL)
$c_{i,inic}$	Concentração do componente i na fase líquida na condição inicial (mg/mL)
$c_{i,j}$	Concentração do componente i na seção j (mg/mL)
$c_{i,pi}$	Concentração do soluto i no platô intermediário (mg/mL)
C	Coefficiente da equação de van Deemter
CS	Consumo de solvente (L/g)
d_p	Diâmetro das partículas (μm)
D	Diâmetro da coluna (cm)
D_L	Coefficiente de dispersão axial
D_m	Difusividade molecular
D_p	Difusividade no poro
H	Altura equivalente a um prato (cm)
He	Constante de Henry
k	Fator de retenção
k_f	Coefficiente de transferência de massa externo
k_m	Coefficiente de transferência de massa global (min^{-1})
K_p	Constante de equilíbrio de adsorção
L	Comprimento da coluna (cm)

m_{ads}	Massa de adsorvente (mg)
m_j	Razão entre as vazões efetivas de líquido e de sólido na seção j
$n_{i,j}$	Fluxo mássico efetivo do componente i na seção j
N_p	Número de pratos
P	Pureza (%)
Pe	Número de <i>Peclet</i>
Pr	Produtividade (g/L.dia)
q_i	Concentração do soluto i na fase estacionária
q_i^*	q_i em equilíbrio com c_i
q_s	Capacidade de saturação dos sítios enantiosseletivos
q_{ns}	Capacidade de saturação dos sítios não seletivos
Q	Vazão de fase móvel (mL/min)
Q_j	Vazão na seção j (mL/min)
Q_S	Vazão volumétrica de sólido (mL/min)
R	Constante dos gases ideais (0,082 atm.L/mol.K)
r^2	Coefficiente de correlação
Rec	Recuperação (%)
Rs	Resolução do sistema
t_{inj}	Tempo de injeção (min)
t_{VM}	Tempo de retenção referente ao volume morto (extracoluna) (min)
$t_{R,i}$	Tempo de retenção do soluto i (min)
t_0	Tempo de retenção do composto não retido à fase estacionária (min)
t^*	Tempo de troca das posições na unidade LMS (min)
T	Temperatura (K)
T_{iso}	Temperatura de isoenantiosseletividade (°C)
u	Velocidade intersticial da fase móvel (cm/s)
u_0	Velocidade superficial da fase móvel (cm/s)
V_{ads}	Volume de adsorvente (mL)
V_0	Volume de retenção do composto não retido à fase estacionária (mL)
V_C	Volume da coluna (mL)
V_{inj}	Volume de injeção (mL)
V_M	Volume morto extracoluna (mL)

V_1	Volume de retenção da primeira frente de adsorção (mL)
V_{1+2}	Volume de retenção da segunda frente de adsorção (mL)
w_h	Largura do pico a meia altura
z	Comprimento longitudinal da coluna (cm)
ΔG^0	Energia livre de Gibbs (kJ/mol)
ΔH^0	Entalpia de adsorção (kJ/mol)
ΔS^0	Entalpia de adsorção (J/mol.K)
$\Delta(\Delta G^0)$	Variação da energia livre de Gibbs (kJ/mol)
$\Delta(\Delta H^0)$	Variação da entalpia de adsorção (kJ/mol)
$\Delta(\Delta S^0)$	Variação da entropia de adsorção (J/mol.K)

Símbolos gregos

α	Fator de separação
ε	Porosidade do leito
ε_T	Porosidade total do leito
ε_p	Porosidade da partícula
ε^0	Parâmetro de polaridade
λ	Comprimento de onda (nm)
μ	Viscosidade dinâmica (mPa.s)
μ_n	n -ésimo momento
γ_1	Parâmetro da equação da dispersão axial
γ_2	Parâmetro da equação da dispersão axial
ϕ	Coefficiente de associação do solvente
ρ	Massa específica (g/cm ³)
σ	Desvio padrão
σ^2	Variância

Abreviaturas

CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DATD	Dialil-L-tartardiamida
DC	Dicroísmo circular
EDP	Equação diferencial parcial
EtOAc	Acetato de etila
EtOH	Etanol
FEQ	Fase estacionária quiral
FM	Fase móvel
LMS	Leito móvel simulado
LMV	Leito móvel verdadeiro
MM	Massa molecular
MTBE	Metil- <i>terc</i> -butiléter
PDE4	Fosfodiesterase IV
PE	Ponto de ebulição
TBB	<i>Terc</i> -butilbenzoil
TTBB	1,3,5-tri- <i>terc</i> -butilbenzeno
UV-VIS	Ultravioleta-visível

Capítulo 1

1. INTRODUÇÃO

O presente trabalho de pesquisa foi realizado com o intuito de obter os parâmetros necessários para proceder a separação do fármaco antidepressivo rolipram pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando fase estacionária quiral *O,O'*-bis[4-*tert*-butilbenzoil]-*N,N'*-dialil-*L*-tartardiamida. Neste capítulo será levantado o porquê de se desejar os enantiômeros separados e qual a motivação para a realização do trabalho. Finalizando o capítulo, os objetivos irão traçar o caminho que será seguido para alcançar os resultados desejados.

1.1. COLOCAÇÃO DO PROBLEMA

A necessidade de se obter enantiômeros individualmente separados para testes clínicos tem se tornado de extrema prioridade em pesquisa farmacêutica e desenvolvimento de novos medicamentos. Atualmente, as autoridades reguladoras requerem que os novos fármacos sejam testados com o enantiômero adequado já em seu estágio inicial de desenvolvimento (UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 1992). Esta necessidade está diretamente relacionada com o conhecimento dos diferentes efeitos que os enantiômeros podem apresentar nos sistemas biológicos (MILLER et al., 1999). Uma maneira para a separação de enantiômeros por cromatografia é a derivação das misturas enantioméricas para a formação de misturas diastereoisoméricas, que podem ser separadas usando-se fases estacionárias aquirais. No entanto, esta metodologia torna o processo indireto e trabalhoso. Métodos não-cromatográficos, como cristalização usando

formação salina diastereomérica ou síntese assimétrica, também são processos trabalhosos, com consumo excessivo de tempo (LINDHOLM; FORNSTEDT, 2005). Uma alternativa que vem sendo trabalhada para contornar esta desvantagem é a técnica de cromatografia líquida com fase estacionária quiral, que separa os enantiômeros com rapidez e, se devidamente utilizada, com alta eficiência.

A Figura 1.1 mostra a evolução do desenvolvimento de fármacos até 2001. Observa-se que a maioria das moléculas apresenta centros quirais e que o desenvolvimento de um único enantiômero vem aumentando de modo significativo.

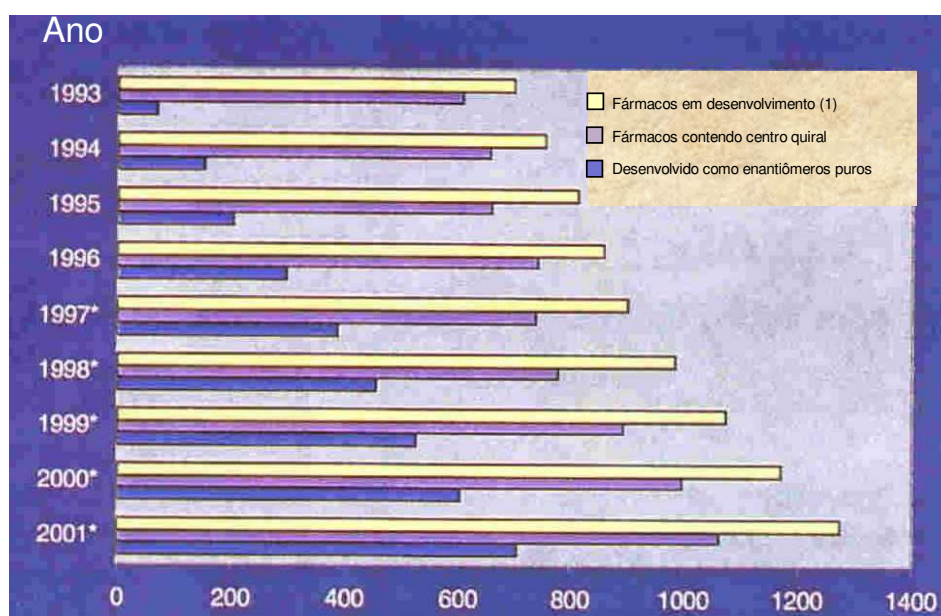


Figura 1.1. Distribuição de medicamentos em desenvolvimento no mundo. (1) Exceto antibióticos. (*) valores estimados [adaptado de Rekoske (2001)].

A comercialização de medicamentos que possuam pureza enantiomérica elevada tem-se mostrado com um crescimento contínuo em todo o mundo, sendo que, em 2000, entre os 500 fármacos mais vendidos no mundo, 269 já eram comercializados como um único enantiômero (MAIER; FRANCO; LINDER, 2001).

1.2. MOTIVAÇÃO PARA O TRABALHO

O rolipram é um fármaco que exibe potente e seletiva atividade inibidora sobre a enzima fosfodiesterase IV (PDE4) e isto bloqueia a série de eventos bioquímicos que conduz a processos inflamatórios. Apesar de apresentar efeito emético (HEASLIP; EVANS, 1995), ele tem demonstrado atividades imunossupressiva (DEMNITZ et al., 1998), antidepressiva (NIBUYA; NESTLER; DUMAN, 1996) e neuroprotetiva (KATO et al., 1995). Dal Piaz e Giovannoni (2000) revelaram também seu potencial no tratamento da asma e obstrução pulmonária crônica.

Os enantiômeros do fármaco rolipram exibem diferentes potenciais farmacológicos no organismo. O enantiômero *R*-(-) é cerca de 3 vezes mais potente na inibição da enzima PDE4 e 20 vezes mais estereosseletivo aos sítios de ligação do que o *S*-(+) (SOUNESS; ALDOUS; SARGENT, 2000). Para se ter um fármaco mais seguro e eficiente é melhor a separação de seus enantiômeros antes de sua utilização.

Seu potencial farmacológico tem sido demonstrado pela administração *in vivo* da mistura racêmica (TEIXEIRA et al., 1997; YAMASHITA et al., 1997; BARAD et al., 1998; DAL PIAZ; GIOVANNONI, 2000; PEARSE et al., 2004), havendo poucos estudos clínicos na literatura científica revelando o potencial dos enantiômeros separados (SOUNESS; SCOTT, 1993). Possivelmente pelo alto valor comercial deste princípio ativo. A Tocris (EUA) tem como preço de venda de 50 mg da mistura \$265,00 e a mesma quantidade dos enantiômeros \$599,00 (valores obtidos no *site* da empresa em 03/07/2006). Encargos de importação aumentariam os custos. Por motivos como estes, técnicas de isolamento dos enantiômeros surgem como alternativa bastante viável, uma vez tendo a mistura. O laboratório de síntese orgânica do Instituto de Química da Unicamp já demonstrou uma rota sintética para a produção da mistura enantiomérica do rolipram no trabalho de Garcia et al. (2005).

Os métodos cromatográficos baseados em fase estacionária quiral podem fornecer ambos enantiômeros com elevado grau de pureza óptica, em um tempo relativamente curto. Estes métodos têm sido os mais utilizados para separar, isolar e analisar enantiômeros, particularmente nos estágios de formulação e desenvolvimento de novos medicamentos (FRANCOTTE, 2001). Os métodos cromatográficos analíticos podem ser ampliados a uma

escala preparativa ou até mesmo para processos contínuos usando a tecnologia do leito móvel simulado (LMS) (MAZZOTTI; STORTI; MORBIDELLI, 1997b).

Seguindo este contexto, vários foram os fatores que motivaram a realização deste trabalho de pesquisa. Dentre os quais podem ser citados:

- A boa separação cromatográfica do rolipram em testes preliminares realizados no laboratório utilizando coluna contendo fase estacionária *O,O'*-bis[4-*terc*-butilbenzoil]-*N,N'*-dialil-L-tartardiamida.
- A ausência, na literatura científica, de trabalhos demonstrando o potencial de separação dos enantiômeros do rolipram na fase estacionária citada.
- O fato de o rolipram ter se revelado um fármaco com potencial no tratamento de diferentes doenças.
- Disponibilizar as formas enantioméricas enriquecidas para a realização de testes *in vivo*, a fim de estudar a atuação individual dos enantiômeros.
- Possibilidade de agregar valor comercial ao produto pela separação dos enantiômeros.

1.3. OBJETIVOS

O objetivo geral do trabalho tratou-se de estudar o processo de separação enantiomérica do fármaco antidepressivo rolipram pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando coluna empacotada com a fase estacionária quiral *O,O'*-bis[4-*terc*-butilbenzoil]-*N,N'*-dialil-L-tartardiamida.

Para atingir o objetivo geral traçaram-se os seguintes objetivos específicos:

- Otimizar a separação cromatográfica do rolipram no quesito composição da fase móvel, partindo de diferentes combinações de solventes e avaliar uma faixa de comprimento de onda para o sistema de detecção;
- Verificar a influência da vazão de fase móvel e temperatura no processo de separação;
- Determinar os parâmetros de separação cromatográfica e de transferência de massa na região linear da isoterma de adsorção;

- Analisar a viabilidade da separação de acordo com a termodinâmica do processo;
- Avaliar a saturação da coluna cromatográfica em condições de alta concentração;
- Caracterizar oito colunas cromatográficas, necessárias para a etapa de simulação do processo de separação em leito móvel simulado;
- Determinar as condições de equilíbrio dos enantiômeros na passagem pela coluna, por meio de suas isotermas de adsorção;
- Obter os enantiômeros separados do rolipram seguindo uma metodologia de separação em batelada;
- Determinar a região de separação dos enantiômeros para um sistema de cromatografia contínua, de acordo com a teoria do equilíbrio, lançando mão de modelos ideal e não ideal.
- Avaliar as variáveis de desempenho em diferentes pontos localizados no interior de uma região de separação de alta pureza;
- Simular o perfil de concentração interno no sistema e o perfil de concentração transiente nas correntes de saída em uma condição otimizada.

Capítulo 2

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada uma revisão da literatura sobre aspectos que são relevantes para o entendimento e desenvolvimento do processo de separação enantiomérica em cromatografia líquida e para interpretação dos resultados alcançados pelos experimentos realizados em laboratório. Será dado enfoque à técnica de separação cromatográfica quiral e apresentado um embasamento teórico dos métodos utilizados para a determinação de parâmetros relacionados ao processo de separação, em pequena e larga escala. Para o caso da produção em larga escala serão apresentados, em termos gerais, modelos utilizados para a simulação do processo contínuo em LMS.

2.1. O ROLIPRAM

Rolipram ou 4-(3-ciclopentoxi-4-metoxifenil)-pirrolidinona-2, cuja fórmula estrutural está apresentada na Figura 2.1, é um fármaco que exibe potente e seletiva atividade inibidora sobre a fosfodiesterase IV (PDE4), principal enzima que regula a concentração da adenosina 3',5' monofosfato em processos inflamatórios (MERCK INDEX, 1996).

A clivagem da ponte do fosfodiester bloqueia a ação desse mensageiro secundário e também a cascata de eventos bioquímicos que conduz a processos inflamatórios. A ação da PDE4 está também relacionada a um conjunto de processos patológicos do sistema nervoso central, tais como: a esclerose múltipla, falha coronária, asma e diabetes. Devido à

importância da PDE4 em numerosos processos bioquímicos, o uso de inibidores potenciais tem recebido considerável atenção da indústria farmacêutica.

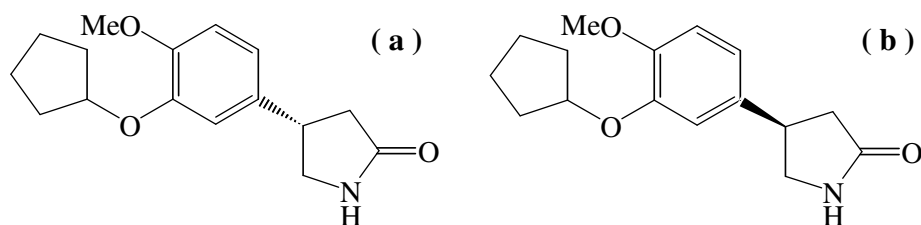


Figura 2.1. Estrutura molecular do rolipram: (a) (R)-(-)-rolipram, (b) (S)-(+)-rolipram.

2.2. ENANTIÔMEROS DE FÁRMACOS QUIRAIS

O campo farmacêutico tem mostrado um número expansivo de aplicações de separações cromatográficas quirais. A utilização de FEQs como ferramenta analítica para a determinação da composição de misturas enantioméricas, em estudos biológicos e farmacocinéticos, é atualmente uma técnica bem estabelecida, como reportado por Francotte (1994). No entanto, a aplicação do método na escala preparativa para a produção de materiais opticamente ativos, em quantidades suficientes para testes biológicos, estudos toxicológicos e posteriormente, testes clínicos, está ganhando ampla aceitação. Com isso, o método cromatográfico oferece a vantagem de fornecer ambos enantiômeros requeridos para os testes comparativos. Essa aproximação é também largamente aplicada para fármacos que não são facilmente acessíveis por uma rota sintética. Pelo menos durante a fase de testes preliminares de novos fármacos quirais, a técnica de cromatografia permite acesso rápido aos enantiômeros puros e podem vantajosamente substituir a elaboração frequentemente prolongada de uma síntese enantiosseletiva. Uma grande variedade de fármacos racêmicos já tem sido separada em FEQs, cobrindo diferentes classes terapêuticas de compostos tais como: analgésicos, tranqüilizantes, diuréticos, anticonvulsivos.

2.3. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA QUIRAL

A obtenção de enantiômeros puros representa um grande desafio à química moderna, devido às propriedades termodinâmicas similares dos mesmos. A habilidade de separar enantiômeros tanto em condições analíticas quanto preparativas é de importância crucial (DUAN; CHING; SWARUP, 1998). Um grande avanço foi conseguido a este respeito, nas últimas décadas, por intermédio da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), baseada em fase estacionária quiral, por se tratar de um processo direto, pela simplicidade na determinação da pureza enantiomérica e ser de fácil extensão para a escala preparativa. A resolução direta é possível desde que exista reconhecimento quiral entre a mistura enantiomérica e o seletor quiral (PARK et al., 2004).

No passado, os problemas vindos do uso de fármacos opticamente ativos foram largamente ignorados. O mais bem documentado exemplo disto é o caso da talidomida. Na década de 50 esta substância era comercializada por uma indústria alemã para tratamento de infecções respiratórias. Associada a outras substâncias passou a ser administrada como um sedativo. Enquanto seu enantiômero *S* promovia o efeito terapêutico, o enantiômero *R* confirmou posteriormente ser um potencial teratogênico (REKOSKE, 2001), ou seja, causador de defeitos congênitos em recém-nascidos (SCHÜLER-FACCINI et al., 2002). Estes acontecimentos se davam possivelmente devido às dificuldades que envolviam a separação enantiomérica tanto na escala analítica quanto preparativa. No entanto, nos últimos anos, aumentou a pressão exercida pela comunidade científica para restringir o uso de fármacos quirais em sua forma racêmica. Por esta razão, as indústrias farmacêuticas têm se tornado, cada vez mais, interessadas em métodos para obtenção de enantiômeros puros (LIM; CHING; TAN, 1995).

Basicamente, duas são as maneiras de se obter as formas enantioméricas puras dos compostos. A primeira consiste na preparação do material racêmico, que é posteriormente separado em suas formas enantioméricas. O segundo método é baseado na síntese estereosseletiva, que conduz a produção de apenas um enantiômero. Embora este último caso tenha sido extensamente utilizado, muitas vezes ele pode ser de alto custo, devido o grande número de etapas envolvidas e o alto valor dos reagentes requeridos (RODRIGUES; PAIS, 2004). Por esta razão os métodos de separação, como a cromatografia, surgem como alternativa vantajosa.

A cromatografia líquida preparativa é cada vez mais um importante processo de separação para o isolamento e purificação de formas farmacêuticas, biomoléculas e outros produtos de valor agregado. A necessidade de produtos com alto grau de pureza faz crescer a importância das separações enantioméricas e aumenta a disponibilidade de fases estacionárias com alto fator de separação, que promovem esta tendência (SEIDEL-MORGENSTERN, 2004).

Uma das maneiras para promover a separação de enantiômeros por cromatografia é a derivação das misturas enantioméricas para a formação de misturas diastereoisoméricas, que podem ser separadas usando-se fases estacionárias aquirais. No entanto, esta metodologia torna o processo indireto e trabalhoso.

A separação cromatográfica com fase estacionária quiral não difere basicamente dos métodos clássicos de cromatografia, tendo a vantagem da diferença das energias de interação entre dois diferentes solutos e a fase estacionária. Em um ambiente quiral, dois enantiômeros podem ser considerados como compostos fisicamente distintos. Uma vez possuindo arranjo configuracional oposto de seus átomos no espaço, os enantiômeros podem interagir diferentemente com um ambiente quiral. A diferenciação quiral pode ser exercida tanto por uma fase móvel quiral quanto por uma fase estacionária quiral. Assim, a diferença da cromatografia convencional reside apenas no tipo de fase móvel ou estacionária empregada (FRANCOTTE; JUNKER-BUCHHEIT, 1992).

O mecanismo de separação de enantiômeros está fundamentado na diferença de energia entre os complexos diastereoisoméricos transitórios formados entre o seletor quiral e os enantiômeros do soluto. As diferenças em estabilidade destes complexos transitórios levam a diferentes tempos de retenção dos enantiômeros na coluna. O enantiômero que forma o complexo menos estável elui primeiro.

O potencial do método cromatográfico para a separação em escala preparativa, usando fase estacionária quiral, foi reconhecido durante as primeiras tentativas com lactose por Henderson e Rule (1939). Desde então, o método sofreu um desenvolvimento espetacular, devido à evolução concomitante das técnicas cromatográficas e ao surgimento de numerosas fases quirais. Diferentes razões podem ser atribuídas a este forte desenvolvimento: 1) a importância da relação entre a estereoquímica de um composto quiral e sua atividade biológica ter sido reconhecida; 2) em paralelo, a síntese

enantiosseletiva ter sido considerada uma novidade, prometendo desafios na química orgânica e necessitando inovações e suporte analítico; 3) em muitos casos a cromatografia ser o método mais eficiente e rápido para a preparação dos enantiômeros ou ainda, única alternativa na impossibilidade de sua síntese (FRANCOTTE; JUNKER-BUCHHEIT, 1992).

2.4. FASE ESTACIONÁRIA QUIRAL

Uma fase estacionária quiral (FEQ) consiste em uma matriz aquiral, por exemplo, sílica porosa, com ligantes quirais na maioria das vezes ligados quimicamente. Esses ligantes podem ser pequenos, como fases de Pirkle ou maiores, como ciclodextrinas. No entanto, podem também ser macromoléculas, como derivados de celulose, glicopeptídeos macrocíclicos ou proteínas imobilizadas (LINDHOLM; FORNSTEDT, 2005; GÖTMAR; ALBAREDA; FORNSTEDT, 2002).

A fase estacionária quiral utilizada neste trabalho é obtida a partir do precursor *N,N'*-dialil-L-tartardiamida (DATD) pela derivação de grupos hidroxila, conforme apresentado na Figura 2.2. O polímero quiral gerado é posteriormente imobilizado em sílica funcionalizada por meio de ligações covalentes (LINDHOLM; FORNSTEDT, 2005), atribuindo à fase estacionária quiral maior eficiência e maior capacidade de saturação.

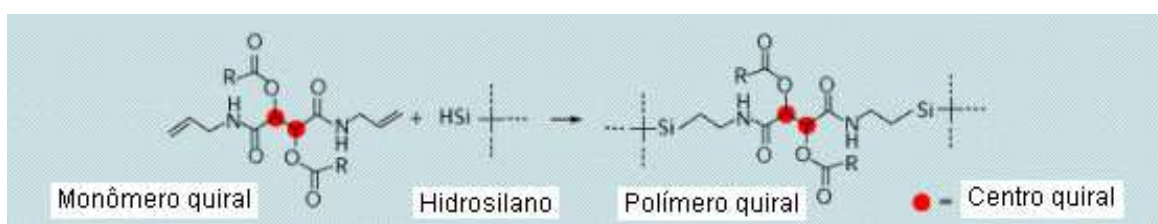


Figura 2.2. Seqüência reacional para produção do polímero quiral a ser ligado à sílica para formar a fase estacionária quiral [adaptado de Eka Chemicals (2006)].

Quando o radical R é *O,O'*-bis[4-*terc*-butilbenzoil], atribuímos a denominação TBB a essa fase estacionária, que passa a se apresentar de acordo com a configuração estrutural dada pela Figura 2.3. O radical TBB é ancorado à rede polimérica por uma reação

de entrecruzamento, que também causa a ligação covalente à sílica (ALLENMARK et al., 1995).

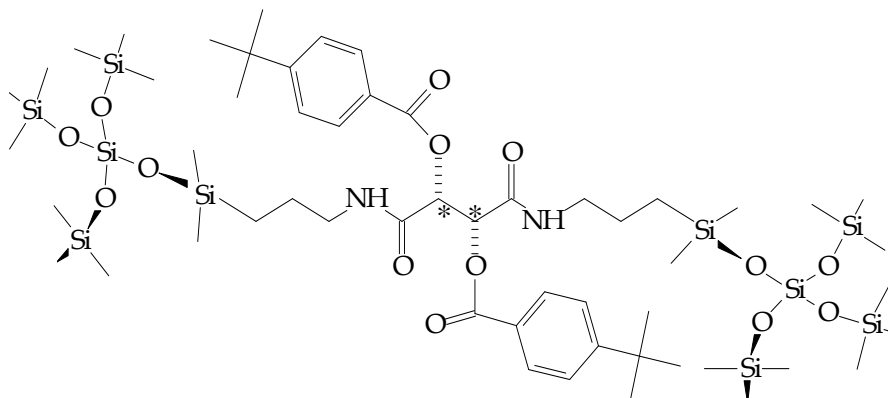


Figura 2.3. Estrutura da fase estacionária baseada no seletor quiral TBB (SKOGSBERG, 2001).

Como pode ser visto na Figura 2.3, a rede polimérica resultante incorpora um grupo seletor quiral C_2 -simétrico bifuncional representado pelos asterísticos (ALLENMARK et al., 1995). De acordo com Andersson et al. (1996) esta FEQ mostra bom poder de separação para ambos compostos, ácidos e básicos, além de compostos neutros.

A Figura 2.4 mostra as partículas da sílica utilizada para confecção da fase estacionária contida nas colunas Kromasil[®] CHI-TBB em dois diâmetros 3,5 μm e 10 μm . As partículas porosas apresentam formato bastante próximo ao esférico e com uniformidade na distribuição de tamanho (EKA CHEMICALS, 2006).

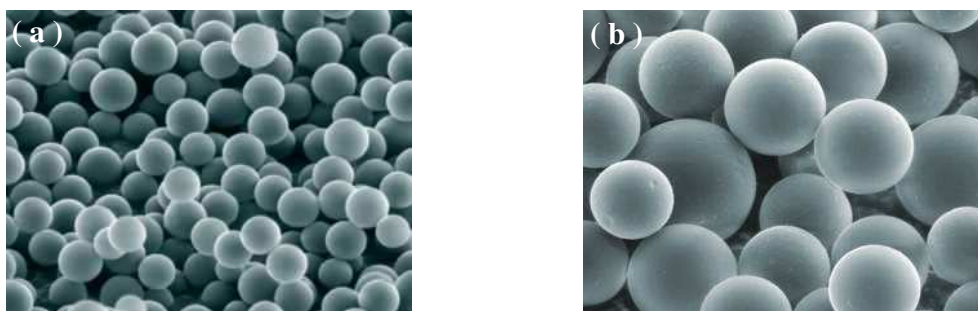


Figura 2.4. Partículas da sílica Kromasil utilizadas nas colunas Kromasil[®] CHI-TBB de tamanhos: (a) 3,5 μm e (b) 10 μm (EKA CHEMICALS, 2006).

Segundo Francotte (2001), a fase estacionária citada tem separado uma grande quantidade de enantiômeros com capacidade de adsorção intermediária às fases estacionárias baseadas em antibióticos e ciclodextrina, e àquelas que se baseiam em polissacarídeos. A boa retenção e a alto fator de separação são principalmente causados por múltiplas ligações de hidrogênio, mas interações espaciais do tipo π - π também são consideradas presentes e, Andersson, Balmér e Persson (1999) destacam grande importância destas últimas.

2.5. CROMATOGRAFIA LINEAR E NÃO-LINEAR

Na cromatografia linear, as concentrações de equilíbrio do soluto na fase estacionária e na fase móvel são proporcionais, ou seja, as isotermas de equilíbrio são retas partindo da origem. O formato da banda cromatográfica individual e os tempos de retenção são independentes da composição e da quantidade de amostra. A altura do pico cromatográfico é proporcional à quantidade de cada componente na amostra injetada. A cromatografia linear informa bem a maioria dos fenômenos observados nas aplicações analíticas, desde que a quantidade injetada dos componentes da amostra seja mantida suficientemente baixa (GUIOCHON; SHIRAZI; KATTI, 1994).

Para o caso da cromatografia não-linear, a concentração de um componente na fase estacionária em equilíbrio não é proporcional a sua concentração na fase móvel. Essa isoterma também depende da concentração de todos os outros componentes da mistura. Esta é a situação encontrada na grande maioria das aplicações cromatográficas. Os problemas da cromatografia não-linear são extremamente complexos devido à interdependência dos perfis individuais, causados pela dependência da quantidade de cada componente na solução contendo as várias espécies (GUIOCHON; SHIRAZI; KATTI, 1994).

2.6. MÉTODO DOS MOMENTOS

A análise dos momentos é uma ferramenta usual para determinação dos coeficientes de dispersão axial, difusão no poro (MIYABE; SUZUKI, 1992) e até mesmo propriedades de um leito fixo, como suas porosidades, a partir de experimentos de pulsos cromatográficos. Esta técnica consiste na análise da concentração do soluto como uma função do tempo na saída do leito fixo em resposta à concentração do soluto no pulso na entrada do leito. Para soluções diluídas, a curva de equilíbrio sólido-líquido pode ser representada por uma reta (lei de Henry). A inclinação desta reta pode ser determinada a partir do primeiro momento de um pulso do soluto, o qual é associado ao tempo de retenção do soluto. Parâmetros de transferência de massa podem ser obtidos a partir do segundo momento. Neste trabalho, o método de análise dos momentos foi usado para determinar as constantes de adsorção e a porosidade do leito.

Por definição dos momentos de uma distribuição, o n -ésimo momento do perfil de banda na saída do leito cromatográfico de comprimento $z = L$ é calculado pela Equação 2.1 (GUIOCHON; SHIRAZI; KATTI, 1994).

$$M_n = \int_0^{\infty} c(t, L) t^n dt \quad (2.1)$$

O n -ésimo momento absoluto ou normalizado é então expresso pela Equação 2.2.

$$\mu_n = \frac{M_n}{M_0} = \frac{\int_0^{\infty} c(t, L) t^n dt}{\int_0^{\infty} c(t, L) dt} \quad (2.2)$$

e o n -ésimo momento central é dado pela Equação 2.3.

$$\bar{\mu}_n = \frac{\int_0^{\infty} c(t, L) \cdot (t - \mu_1)^n dt}{\int_0^{\infty} c(t, L) dt} \quad (2.3)$$

O primeiro momento absoluto de um pico cromatográfico μ_1 , ou simplesmente μ , é relacionado ao tempo de retenção do pico e conseqüentemente, à força de ligação, por exemplo, a constante de equilíbrio (ARNOLD; BLANCH; WILKE, 1985a; ARNOLD; BLANCH; WILKE, 1985b) e é calculado pela Equação 2.4.

$$\mu = t_R = \frac{L}{u_0} [\varepsilon + (1 - \varepsilon)\varepsilon_p + (1 - \varepsilon)(1 - \varepsilon_p)K_p] + \frac{t_{inj}}{2} \quad (2.4)$$

em que, u_0 é a velocidade superficial de escoamento da fase móvel e t_{inj} o tempo de injeção.

O segundo momento central $\bar{\mu}_2$ é relacionado ao espalhamento do pico, causado por desvios do equilíbrio. Quando o pico cromatográfico de eluição for Gaussiano, $\bar{\mu}_2$ torna-se igual à variância σ^2 (ARNOLD; BLANCH; WILKE, 1985b) fica expresso pela Equação 2.5 (RUTHVEN, 1984).

$$\bar{\mu}_2 = \sigma^2 = \frac{2L}{u} \left\{ \frac{D_L}{u^2} \left[1 + \left(\frac{\varepsilon}{1 - \varepsilon} \right) \frac{1}{K} \right]^2 + \left(\frac{\varepsilon}{1 - \varepsilon} \right) \frac{1}{Kk_m} \right\} + \frac{t_{inj}^2}{12} \quad (2.5)$$

em que, u é a velocidade intersticial ($u = u_0/\varepsilon$) e K é dado pela Equação 2.6.

$$K = \varepsilon_p + (1 - \varepsilon_p)K_p \quad (2.6)$$

Para o caso em que o soluto é um composto que não sofre adsorção na fase estacionária ($K_p = 0$), o primeiro momento fica simplificado de acordo com a Equação 2.7, utilizada para a determinação das porosidades total e do leito.

$$\mu_1 = t_R = \frac{L}{u_0} [\epsilon + (1-\epsilon)\epsilon_p] + \frac{t_{inj}}{2} \quad (2.7)$$

2.7. ALTURA EQUIVALENTE A UM PRATO

A altura equivalente a um prato (H) mede a eficiência das condições cromatográficas por meio dos tempos de retenção obtidos e do alargamento de bandas. Este parâmetro é normalmente utilizado para avaliar o desempenho da coluna, admitindo-se uma escolha adequada das condições (CASS; DEGANI, 2001). Para um sistema com isoterma de adsorção linear, ou seja, sob condições de diluição infinita, a eficiência de uma coluna cromatográfica pode ser avaliada a partir de H , de acordo com a Equação 2.8. Baixo valor de H significa maior eficiência da coluna, que resulta em um alto valor do número de pratos (N_p) (SNYDER; KIRKLAND, 1979).

$$H = \frac{\sigma^2 \cdot L}{\mu_1^2} = \frac{L}{N_p} \quad (2.8)$$

em que, L é o comprimento da coluna e N_p é calculado pela Equação 2.9.

$$N_p = 5,54 \cdot \left(\frac{t_{R,i}}{w_{h,i}} \right)^2 \quad (2.9)$$

Combinando-se as Equações 2.4 e 2.5 com a 2.8, tem-se como resultado a Equação 2.10, sugerida por Böcker et al. (2002) e Ruthven (1984).

$$H = \frac{2D_L}{u} + 2u \left(\frac{\varepsilon}{1-\varepsilon} \right) \frac{1}{Kk_m} \left[1 + \left(\frac{\varepsilon}{1-\varepsilon} \right) \frac{1}{K} \right]^{-2} \quad (2.10)$$

em que,

$$K = \varepsilon_p + (1-\varepsilon_p)He \quad (2.11)$$

Nas equações apresentadas, D_L é o coeficiente de dispersão axial da coluna, k_m o coeficiente de transferência de massa global e He a constante de Henry.

De acordo com Guiochon, Shirazi e Katti (1994), considera-se que a dispersão axial resulta de dois mecanismos diferentes, difusão molecular e difusão turbilhonar. Como primeira aproximação, estes efeitos se somam de forma que o coeficiente de dispersão seja representado pela Equação 2.12.

$$D_L = \gamma_1 D_m + \gamma_2 d_p u \quad (2.12)$$

em que, D_m é o coeficiente de difusão molecular, γ_1 e γ_2 são constantes que possuem normalmente valores 0,7 e 0,5 respectivamente (RUTHVEN, 1984).

A altura equivalente a um prato é função da geometria da coluna e empacotamento, das condições de operação, das propriedades do soluto e das interações do soluto com a fase móvel e com a fase estacionária. Para uma dada separação cromatográfica em que o sistema, o empacotamento da coluna e o soluto já são definidos, H é função da velocidade superficial de escoamento da fase móvel (u_0) (ARNOLD; BLANCH; WILKE, 1985b). Isso permite obter informações a cerca de fenômenos de transferência de massa. Geralmente é assumido que a transferência de massa em colunas cromatográficas consiste em vários processos, dentre os quais, os quatro principais normalmente considerados são: *i*) dispersão axial; *ii*) transferência de massa do fluido para

partícula; *iii*) difusão intraparticular; e *iv*) adsorção/dessorção (MIYABE; GUIOCHON, 1999).

O valor de H para uma coluna cromatográfica pode ser calculado aproximadamente pela equação de van Deemter (Equação 2.13).

$$H = A + \frac{B}{u_o} + C.u_o \quad (2.13)$$

em que, A , B e C são coeficientes empíricos (GUIOCHON, 2002). O termo A refere-se ao alargamento dos picos devidos aos caminhos tortuosos seguidos pelas moléculas da amostra. Para minimizar este termo é necessário usar colunas com diâmetros internos pequenos, bem recheadas e partículas com tamanho pequeno e uniforme. O termo B está relacionado com a difusão molecular do soluto na fase móvel, podendo ser minimizado trabalhando-se com a massa específica da fase móvel (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). O termo C é uma função dos efeitos de transferência de massa do soluto entre as fases móvel e estacionária. Neste caso, vazões menos de fase móvel minimizam estes efeitos (SMITH, 2002; COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

O primeiro termo da Equação 2.12, referente à difusão molecular para a dispersão axial, geralmente é pouco pronunciado perante o segundo termo, sendo normalmente percebido a baixas velocidades de escoamento de fluido. Neste caso, uma equação modificada de van Deemter (Equação 2.14) é originada a partir da Equação 2.13 (MIYABE; GUIOCHON, 1999).

$$H = A + C.u_o \quad (2.14)$$

sendo que:

$$A = 2\gamma_2 d_p \quad (2.15)$$

e

$$C = 2 \left(\frac{\varepsilon}{1-\varepsilon} \right) \frac{1}{Kk_m} \left[1 + \left(\frac{\varepsilon}{1-\varepsilon} \right) \frac{1}{K} \right]^{-2} \quad (2.16)$$

A Figura 2.5 mostra a variação de H com u_0 . A curva 1 corresponde ao primeiro termo do segundo membro da Equação 2.13, sendo independente da velocidade superficial. A curva 3 apresenta-se como uma função linear da velocidade superficial e corresponde ao terceiro termo do segundo membro da Equação 2.13. A difusão molecular (representado pelo segundo termo do segundo membro da Equação 2.13) é inversamente proporcional à velocidade superficial, tratando-se da curva 2 e, por fim, a curva 4 se refere ao perfil resultante de H por u_0 (KRIJGSMAN, 1992) e apresenta um valor de mínimo para a altura equivalente a um prato em uma dada velocidade superficial, chamada ótima. Abaixo desta velocidade, H torna-se fortemente dependente dos efeitos de difusão e a altas velocidades, fortemente dependente do termo de transferência de massa (SEWELL; CLARKE; KEALEY, 1988).

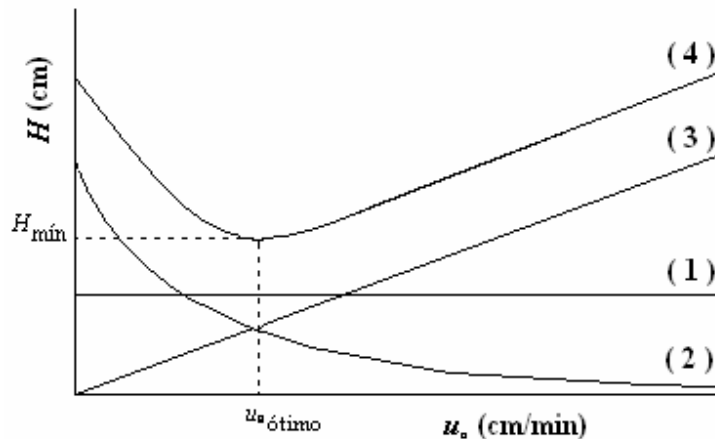


Figura 2.5. Variação de H com u_0 de acordo com a equação de van Deemter.

2.8. ANÁLISE TERMODINÂMICA NA ADSORÇÃO

A separação direta dos enantiômeros é baseada na formação de complexos diastereoisoméricos reversíveis, criados por interações intermoleculares dos enantiômeros com o seletor quiral. Este processo pode ser caracterizado por parâmetros termodinâmicos (ΔG , ΔH e ΔS) (ROJKOVIČOVÁ et al., 2004).

As variações na energia livre de Gibbs (ΔG^0), na transferência do soluto entre as fases móvel e estacionária, são expressas pela Equação 2.17.

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 = -RT \ln\left(\frac{k}{\phi}\right) \quad (2.17)$$

em que, k é o fator de retenção do soluto, ϕ a razão de fase na coluna (volume de fase estacionária pelo volume de fase móvel), R a constante do gases e T a temperatura absoluta. Expressando a energia de Gibbs de acordo com mudanças na entalpia (ΔH^0) e entropia (ΔS^0), o fator de retenção passa a depender da temperatura de acordo com a Equação 2.18.

$$\ln k = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} + \ln \phi \quad (2.18)$$

A inclinação e a intersecção do gráfico $\ln k$ por $1/T$, chamado gráfico de van't Hoff, permitem o cálculo dos parâmetros termodinâmicos na transferência global do soluto da fase móvel para a fase estacionária.

A partir da diferença de energia livre de Gibbs (Equação 2.17) para os dois enantiômeros, pode-se definir o termo $\Delta(\Delta G^0)$. Este é responsável pela maior retenção do segundo enantiômero na fase estacionária quiral (BERTHOD; HE; BEESLEY, 2004). Sua expressão é alcançada pela combinação das Equações 2.17 e 2.18.

$$\Delta(\Delta G^0) = -RT \ln \alpha = \Delta(\Delta H^0) - T\Delta(\Delta S^0) \quad (2.19)$$

Os termos $\Delta(\Delta G^0)$, $\Delta(\Delta H^0)$, $\Delta(\Delta S^0)$ representam as diferenças de energia livre de Gibbs, entalpia e entropia, respectivamente.

No caso de separações quirais, o fator de separação α é o fator primordial que determina a diferença relativa de retenção dos dois enantiômeros. A transferência global de fase dos enantiômeros é composta por uma parte aquiral e outra quiral (BERTHOD; HE; BEESLEY, 2004).

Pode-se estimar a temperatura de isoenantiosseletividade (T_{iso}) para os solutos, de acordo com a Equação 2.20 (WENG et al., 2004). T_{iso} é definida como a temperatura em que os termos de entalpia e entropia são balanceados e $\alpha = 1$. Para temperaturas acima de T_{iso} a separação dos enantiômeros é controlada pelo termo entrópico e ocorre uma inversão na ordem de eluição dos enantiômeros (CIRILLI; LA TORRE, 1998).

$$T_{iso} = \frac{\Delta(\Delta H^0)}{\Delta(\Delta S^0)} \quad (2.20)$$

2.9. ISOTERMAS DE ADSORÇÃO

O estudo do equilíbrio de fase é a parte da termodinâmica que se preocupa com a composição de equilíbrio de duas fases e a influência de vários parâmetros nessa composição, como por exemplo temperatura e pressão (GUIOCHON; SHIRAZI; KATTI, 1994). Para o caso de sistemas de fases usado em cromatografia líquida, uma das fases é a solução de eluição e a outra o sólido adsorvente.

A adequada simulação de um processo de separação cromatográfica requer, principalmente, informações confiáveis de como os componentes da mistura a serem separados se distribuirão, em condições de equilíbrio, entre a fase móvel e a fase estacionária. Este tipo de informação é obtido pelas isotermas de adsorção.

Em geral, isotermas de adsorção podem ser determinadas apenas experimentalmente. Por esta razão, há atualmente um largo número de métodos experimentais disponíveis. Sua aplicação apropriada e eficiente ainda está longe de se tornar um trabalho de rotina. Decidir qual método é apropriado para determinar as isotermas de adsorção, para um problema específico de separação, é uma tarefa difícil, uma vez que não se trata de uma determinação direta da quantidade de soluto adsorvida e sim de considerações de equilíbrio. Normalmente, apenas as isotermas para um único soluto são determinadas por meio de experimentos e as isotermas competitivas são, então, preditas usando modelos de isotermas. No entanto, observa-se com frequência que os conceitos teóricos disponíveis oferecem apenas uma precisão limitada e a determinação experimental dos dados de equilíbrio multicomponente é recomendada. Um aspecto para escolher um método experimental satisfatório é, frequentemente, se e quanto dos componentes puros estão disponíveis para realizar as medidas (SEIDEL-MORGENSTERN, 2004).

2.10. DETERMINAÇÃO DAS ISOTERMAS DE ADSORÇÃO

2.10.1. Métodos estáticos

Os métodos estáticos de determinação de isotermas de adsorção não analisam as curvas de concentração ao longo do tempo, usam apenas as informações dos estados de equilíbrio.

Método batelada

No clássico método batelada, volumes ou massas de adsorventes conhecidos, V_{ads} ou m_{ads} , são equilibrados em um recipiente fechado com uma solução de volume V conhecido, contendo solutos em concentrações iniciais ($c_{i,inic}$) conhecidas. Durante o processo de adsorção, deve-se cumprir os balanços de massas dados pela Equação 2.21.

$$Vc_{i,inic} = Vc_i(t) + V_{ads}q_i(t) \quad (2.21)$$

ou

$$Vc_{i,inic} = Vc_i(t) + m_{ads}\bar{q}_i(t), \quad i = 1, N$$

Para determinar as isotermas de adsorção, apenas as concentrações de equilíbrio final devem ser medidas, $c_{i,eq} = c_i(t \rightarrow \infty)$. As quantidades adsorvidas no estado de equilíbrio por volume ou massa de adsorvente, $q_i(c_{i,eq})$ ou $\bar{q}_i(c_{i,eq})$, são calculados pela Equação 2.21.

A construção das isotermas de adsorção é finalizada após a realização de vários experimentos variando-se parâmetros como: $c_{i,inic}$ e V_{ads}/V ou m_{ads}/V . Estes parâmetros devem ser escolhidos cuidadosamente de forma a cobrir uma larga região das isotermas. O princípio do método batelada é ilustrado na Figura 2.6.

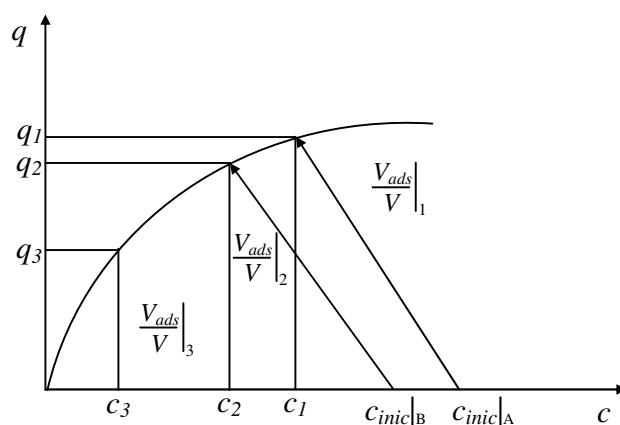


Figura 2.6. Método batelada para determinação de isoterma para um único soluto.

Se um ponto do equilíbrio é determinado (por exemplo, c_1 e q_1) correspondendo a uma certa concentração inicial e quantidade de adsorvente ($c_{inic|A}$ e $V_{ads}/V|_A$), outros pontos podem ser determinados variando a concentração inicial e a quantidade de adsorvente.

Dificuldades relacionadas à determinação da quantidade necessária do material adsorvente e a incertezas quanto ao tempo para se alcançar o estado de equilíbrio normalmente tornam o método sem muita precisão (SEIDEL-MORGENSTERN, 2004).

Método adsorção-dessorção

Este outro método estático está baseado em duas etapas. Inicialmente uma coluna é completamente equilibrada com uma solução de alimentação de concentração conhecida, $c_{i,alim}$. Na condição de equilíbrio, a quantidade do componente i na coluna é dada por n_i , de acordo com a Equação 2.22.

$$n_i = \varepsilon V c_{i,alim} + (1 - \varepsilon) V q_i(\bar{c}_{alim}) \quad (2.22)$$

Na segunda etapa, a coluna é completamente regenerada com um eluente, o qual é coletado e analisado para se determinar n_i . Agora, $q_i(\bar{c}_{alim})$ pode ser calculado usando-se a Equação 2.22. Outros pontos da isoterma são obtidos variando-se a concentração de alimentação. A determinação das isotermas pelos métodos estáticos requer significativo trabalho em laboratório e normalmente não é muito precisa (SEIDEL-MORGENSTERN, 2004).

2.10.2. Métodos dinâmicos

Os métodos dinâmicos são baseados na análise matemática das curvas de resposta correspondentes a mudanças bem definidas nas concentrações de alimentação da coluna.

Análise frontal

É o método mais comumente usado para a determinação de isotermas pela sua acurácia e relativa simplicidade (MIHLBACHLER et al., 2002). Trata-se da análise das respostas de pulsos grandes (alta quantidade de soluto) aplicados ao sistema de separação (SEIDEL-MORGENSTERN, 2004).

A determinação das isotermas de adsorção pelo método da análise frontal é o problema inverso comparado à predição das curvas de ruptura a partir de isotermas conhecidas. A teoria do equilíbrio torna-se uma conveniente ferramenta para predizer

características de tais curvas, como: concentração no platô intermediário e tempo de retenção das frentes de adsorção. Apenas esses dados precisam ser determinados experimentalmente para resolver o problema. Este conceito é aplicado como uma ferramenta padrão para determinar isothermas para um único soluto, a partir da dependência da concentração com o tempo de retenção na região frontal à curva de ruptura. Para isothermas multicomponentes, as curvas de ruptura também podem ser usadas, mas com algumas restrições (JACOBSON; JOHN; HORVÁTH, 1987). A curva de ruptura para uma mistura binária tem duas ondas separadas pelo platô intermediário como apresentado na Figura 2.7.

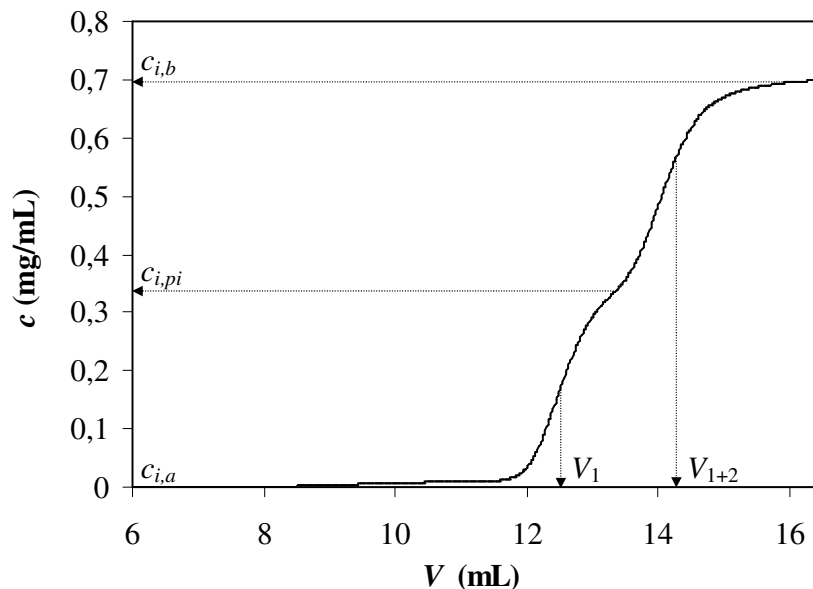


Figura 2.7. Curva de ruptura para uma mistura binária com as indicações dos volumes de retenção e das concentrações nos estágios de uma eluição a uma dada concentração de alimentação.

Se a condição inicial para uma curva de ruptura é que a coluna esteja em equilíbrio com uma concentração finita de alimentação, os tempos de eluição dessas duas ondas dependem dessas concentrações iniciais. Assim, é necessário determinar também a composição da solução que está eluindo pela coluna durante o platô intermediário, ou adotar como condição inicial o equilíbrio com a fase móvel pura, no caso de apenas o

componente puro menos retido ser eluído durante o platô intermediário (MIHLBACHLER et al., 2002).

Para determinar vários pontos da isoterma, são realizadas sucessivas mudanças na concentração de alimentação da coluna, resultando em diferentes curvas de ruptura. Os dados experimentais resultantes são usados na Equação 2.23 (GUIOCHON; SHIRAZI; KATTI, 1994; MIHLBACHLER et al., 2002; JACOBSON; JOHN; HORVÁTH, 1987).

$$q_i = \frac{(V_{1+2} - V_0)(c_{i,b} - c_{i,a}) - (V_{1+2} - V_1)(c_{i,pi} - c_{i,a})}{V_{ads}} \quad (2.23)$$

em que, V_0 , V_1 , V_{1+2} e V_{ads} são o volume de morto do sistema, volume de retenção da primeira e da segunda frentes de adsorção e volume de adsorvente presente na coluna, respectivamente. $c_{i,a}$ e $c_{i,b}$ são as concentrações do componente i na alimentação da coluna em equilíbrio inicialmente (anterior a $t = 0$) e atrás da segunda frente de adsorção (platô superior). $c_{i,pi}$ é a concentração do componente i no platô intermediário.

A determinação dos pontos da isoterma de adsorção pode, também, ser realizada seguindo os princípios do método de análise frontal na região posterior da curva de ruptura, seguindo a Equação 2.24 (MIHLBACHLER et al., 2002).

$$q_i = \frac{(V_{1+2} - V_0)(c_{i,b} - c_{i,a}) + (V_{1+2} - V_2)(c_{i,pi} - c_{i,a})}{V_{ads}} \quad (2.24)$$

em que, agora, V_{1+2} e V_2 são os volumes de retenção da primeira e da segunda frente de dessorção, respectivamente.

Método da perturbação

O método da perturbação requer injeções analíticas em sucessivos platôs crescentes de concentração. Essas injeções podem ser tanto de uma amostra de fase móvel

pura, quanto de uma solução de composição diferente da apresentada no platô. Tal injeção perturba o equilíbrio entre as duas fases e causa, para o caso de uma mistura racêmica, duas perturbações que migram pela coluna (KABIR; GREVILLOT; TONDEUR, 1998; MIHLBACHLER et al., 2002). Um requisito para uma aplicação de sucesso do método da perturbação é que as injeções aplicadas sejam pequenas suficientes para deixar a coluna em equilíbrio. Se assim for, os tempos de retenção resultantes para as respostas não dependerão do tipo de perturbação (SEIDEL-MORGENSTERN, 2004).

Pode-se demonstrar que os volumes de retenção para as perturbações são dados pela Equação 2.25 (MIHLBACHLER et al., 2002; GUIOCHON; SHIRAZI; KATTI, 1994; TONDEUR et al., 1996).

$$V_{r,i}(c_1, \dots, c_n) = V_0 \left(1 + \frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \frac{dq_i}{dc_i} \right), \quad i = 1, \dots, n \quad (2.25)$$

em que, dq/dc_i é a derivada total da isoterma, dada pela Equação 2.26.

$$\frac{dq_i}{dc_i} = \sum_{j=1}^N \frac{\partial q_i}{\partial c_j} \cdot \frac{dc_j}{dc_i}, \quad i = 1, \dots, n \quad (2.26)$$

Em isotermas para um único componente, a derivada total é a derivada convencional. Essas isotermas são obtidas resolvendo a Equação 2.25 para q . Para o caso de isotermas binárias, isso não é possível. A Equação 2.26 envolve as derivadas dc_j/dc_i , que não podem ser obtidas a partir de dados experimentais. No entanto, conhecendo-se uma equação da isoterma, é possível calcular os valores numéricos dos coeficientes desse modelo que melhor se ajustam aos dados experimentais. Para isotermas binárias elas são as soluções da Equação quadrática 2.27.

$$\left(\frac{dc_1}{dc_2}\right)^2 + \frac{dc_1}{dc_2} \cdot \frac{\frac{\partial q_2}{\partial c_2} - \frac{\partial q_1}{\partial c_1}}{\frac{\partial q_2}{\partial c_1}} - \frac{\frac{\partial q_1}{\partial c_2}}{\frac{\partial q_2}{\partial c_1}} = 0 \quad (2.27)$$

As duas raízes são inseridas na Equação 2.26 e os volumes de retenção das perturbações podem agora ser representados como uma função dos parâmetros do modelo da isoterma (MIHLBACHLER et al., 2002).

Eluição por pontos característicos

No método de eluição por pontos característicos a isoterma é obtida a partir da parte posterior do perfil de eluição (frente dispersiva) em condição de sobrecarga, situação alcançada com a injeção de grande quantidade de amostra (GUIOCHON; SHIRAZI; KATTI, 1994).

Se uma frente dispersiva é determinada em uma coluna de alta eficiência, o conhecimento do tempo de retenção $t_R(c)$ permite determinar a inclinação da isoterma de adsorção de um único soluto $dq/dc|_c$ de acordo com a Equação 2.28.

$$t_R(c) = t_{inj} + \frac{L}{u} \left[1 + \frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \cdot \frac{dq}{dc} \Big|_c \right] \quad (2.28)$$

A Equação 2.28 é válida se a frente de desorção do pico for dispersa, o qual é verdade para sistemas Langmuirianos. No caso de sistemas anti-Langmuirianos, a frente de adsorção é dispersa e o tempo de injeção (t_{inj}) deve ser desconsiderado (SEIDEL-MORGENSTERN, 2004).

A principal desvantagem do método é que a quantidade adsorvida é calculada por uma equação provinda de um modelo ideal, que assume eficiência da coluna infinita. Desta forma, deve ser usado apenas com colunas de alta eficiência, onde a contribuição do alargamento da banda é desprezível (GUIOCHON; SHIRAZI; KATTI, 1994).

Do ponto de vista teórico, o método é acurado e um simples perfil de eluição permite a determinação completa da isoterma. No entanto a aplicabilidade é restrita a colunas condicionadas para alto número de pratos. As análises das frentes dispersivas tem sido aplicadas apenas para a determinação de isotermas de um único soluto. Uma extensão para misturas é de difícil aplicação prática (SEIDEL-MORGENSTERN, 2004).

Método do tempo de retenção

Tendo-se modelos para simulação dos picos cromatográficos e para a descrição das isotermas, um deles pode otimizar os parâmetros pela minimização das discrepâncias entre um cromatograma experimental, determinado sob condições de sobrecarga, e o modelo predito (SEIDEL-MORGENSTERN, 2004). Se o modelo é Langmuiriano, a solução analítica para o modelo ideal pode ser invertida e usada para determinar os melhores parâmetros da isoterma, a partir de um pequeno e de um grande volume de injeção da amostra. O pequeno volume de injeção fornece o tempo de retenção sob condições lineares, que se refere à inclinação inicial da isoterma. O tempo de retenção provindo do volume grande de injeção permite a determinação do correspondente valor do fator de carga, conseqüentemente, da capacidade de saturação (GUIOCHON; SHIRAZI; KATTI, 1994). Este método torna-se bastante atrativo porque um grande número de perfis cromatográficos pode ser gerado rapidamente com eficientes sub-rotinas de otimização (SEIDEL-MORGENSTERN, 2004). Apesar do modelo de Langmuir fornecer boa representação dos dados experimentais de equilíbrio para o caso mono-componente, o método é bastante geral (GUIOCHON; SHIRAZI; KATTI, 1994). Normalmente, vários modelos de isotermas podem ser testados alternativamente. A acurácia do método depende de quão larga é a acurácia do modelo aplicado para a coluna. Torna-se recomendado, assim, testar criticamente os modelos (SEIDEL-MORGENSTERN, 2004).

2.11. MODELOS DE ISOTERMAS DE ADSORÇÃO

2.11.1. Modelo linear

Caso a concentração dos solutos na fase móvel seja baixa, o equilíbrio de adsorção pode ser descrito por uma relação linear entre as concentrações nas fases estacionária e móvel ($q_i = He_i \cdot c_i$, em que He trata-se da constante de Henry para o componente i).

2.11.2. Modelo de Langmuir competitivo

O modelo de Langmuir competitivo considera que o processo de adsorção acontece em uma superfície composta de um número fixo de sítios de adsorção de igual energia, uma molécula sendo adsorvida por sítio, até que a cobertura da monocamada seja alcançada (JAMES, 1994). Este modelo é o mais frequentemente utilizado para descrever adsorção não-linear, embora seja assumido que é um modelo muito simples para informar a adsorção em fases estacionárias quirais. A isoterma de Langmuir corresponde a uma cinética de adsorção homogênea e é expressa matematicamente pela Equação 2.29 (FELINGER; ZHOU; GUIOCHON, 2003).

$$q_i^* = q_s \frac{b_i c_i}{1 + b_1 c_1 + b_2 c_2}; \quad i = 1, 2 \quad (2.29)$$

Na Equação 2.29, q_s é a capacidade de saturação da monocamada do adsorvente e b_i é a constante de associação. A constante de Henry (He_i) para o componente i é dada pelo produto $q_s \cdot b_i$.

O modelo de Langmuir tem sido amplamente utilizado para correlacionar dados experimentais obtidos na adsorção sólido-líquido, possuindo limitações devido à restrição a superfícies homogêneas e cobertura da monocamada. A isoterma de Langmuir é, no entanto, conveniente para análise quantitativa de processos de adsorção e tem uma base física, distintamente de tais equações empíricas como o modelo de Freundlich que não tem nenhuma justificativa teórica significativa (JACOBSON; FRENZ; HORVÁTH, 1984). A

grande vantagem deste modelo é o pequeno número de parâmetros requeridos e a simplicidade de sua derivação. De fato, somente três parâmetros são necessários para descrever adsorção competitiva: duas constantes de equilíbrio e a capacidade de saturação (CAVAZZINI et al., 2002).

2.11.3. Modelo bi-Langmuir competitivo

Quando enantiômeros são separados em uma FEQ, é esperado que a fase estacionária seja heterogênea, com uma distribuição de energia bimodal. O modelo de isoterma bi-Langmuir assume que a superfície da FEQ contém dois diferentes tipos de sítios. Sítios não-seletivos, que retêm ambos os enantiômeros com a mesma energia de adsorção, e sítios enantiosseletivos, que interagem diferentemente com estes dois enantiômeros, ligando-se a eles com diferentes energias (com igual ou diferente capacidade de saturação). Assim, as constantes de equilíbrio dos dois enantiômeros nos sítios não-seletivos são iguais e o modelo bi-Langmuir possui apenas cinco parâmetros neste caso. Este modelo pode ser considerado como uma extensão do modelo competitivo de Langmuir quando estes dois tipos de sítios coexistem na superfície da fase estacionária, sendo descrita pela Equação 2.30.

$$q_i^* = q_{ns} \frac{b_{ns,i}c_i}{1 + b_{ns,i}(c_1 + c_2)} + q_s \frac{b_{s,i}c_i}{1 + b_{s,1}c_1 + b_{s,2}c_2}; i = 1,2 \quad (2.30)$$

em que, $b_{ns,i}$ é a constante de equilíbrio para a adsorção nos sítios não-seletivos, $b_{s,i}$ é a constante de equilíbrio para a adsorção nos sítios enantiosseletivos, q_{ns} é a capacidade de saturação dos sítios não-seletivos e q_s é a capacidade de saturação dos sítios enantiosseletivos (FELINGER; ZHOU; GUIOCHON, 2003; ZHOU et al., 2003; CAVAZZINI et al., 2002).

2.12. CONDIÇÕES DE SOBRECARGA NA COLUNA

Quando a sobrecarga da coluna é considerada, dois procedimentos podem ser descritos. O primeiro, sobrecarga de concentração, considera o soluto muito solúvel na fase móvel e é realizado com volume de injeção constante de soluções em concentrações crescentes. Com o aumento da concentração da solução injetada é esperado que os picos cromatográficos sejam distorcidos, chegando a ter a forma de um triângulo. Pode ocorrer o aumento da cauda no pico cromatográfico. O segundo tipo de sobrecarga, sobrecarga de volume, considera o soluto com solubilidade baixa ou até intermediária na fase móvel. A partir de uma solução concentrada, preparada para faixa de solubilidade do analito na fase móvel, volumes crescentes da mesma solução são injetados no sistema cromatográfico. O aumento do volume de injeção, dentre outros fatores, como a força do sorvente usado para diluição, pode resultar na deformação do pico. Os picos cromatográficos tendem a forma simétrica e a partir de um certo volume de injeção sua altura pode manter-se constante (MACHERY-NAGEL, 2000).

2.13. CROMATOGRAFIA PREPARATIVA EM BATELADA

O uso de técnicas cromatográficas para obtenção de quantidades significativas de fármacos enantiomericamente puros é muito bem estabelecido. Separações em batelada e em sistema contínuo, como Leito Móvel Simulado (LMS), têm se tornado nos últimos anos técnicas de rotina para separação de enantiômeros. Mais recentemente a técnica de Reciclo Externo Estacionário surgiu como uma promessa para a aproximação do desempenho do LMS (GRILL; MILLER; YAN, 2004). A utilização de sistemas LMS requer alto investimento em capital, o que nem sempre é possível. O investimento para implementação de um sistema LMS pode variar de US\$ 300.000,00 a US\$ 1.000.000,00, dependendo da escala de produção requerida. Neste contexto, a utilização de técnicas em batelada aparece como uma alternativa satisfatória quando se deseja alcançar a separação dos enantiômeros em quantidades menores, ou seja, pequenas produtividades, suficientes para fases iniciais de desenvolvimento (KENNEDY; BELVO; WILLIAMS, 2004).

O processo em batelada pode ser realizado em mais de uma etapa, como reportado por Grill, Miller e Yan (2004), que em duas etapas alcançou-se pureza de 98 % de excesso enantiomérico. Segundo estes autores, na primeira etapa coleta-se três frações na saída da coluna, em que a primeira corresponde ao enantiômero menos retido, a segunda referente à região intermediária dos enantiômeros e a terceira ao enantiômero mais retido. Dependendo de qual for seu composto de interesse (enantiômero menos ou mais retido), recupera-se o material da primeira ou terceira fração. Dissolve-se na mesma fase móvel e a mistura resultante é realimentada, correspondendo esta à segunda etapa. Maior eficiência neste processo pode ser obtida, de acordo com os autores, realimentando a fração contendo o enantiômero de interesse diretamente à coluna, como num reciclo. Neste caso o resultado para a pureza foi de 98,4 % de excesso enantiomérico. Valor pouco superior, no entanto a produtividade alcançada foi de 514 contra 435 g por dia/kg fase estacionária para o primeiro caso.

2.14. CROMATOGRAFIA PREPARATIVA EM LEITO MÓVEL SIMULADO

Nos últimos anos a cromatografia preparativa tem aumentado sua importância como um processo de separação e purificação nas indústrias farmacêutica, agroquímica e de alimentos, em que técnicas clássicas, como a destilação, evaporação, não são possíveis. Muitas aplicações envolvem cromatografia preparativa em batelada, no entanto, notável inovação tem sido alcançada pelo desenvolvimento da cromatografia contínua em larga escala, que apresenta vantagens significativas em termos de desempenho do processo (GIOVANNI, 2000).

Cromatografia preparativa, em particular Leito Móvel Simulado (LMS), é atualmente uma das mais importantes técnicas de separação quiral na indústria farmacêutica (ZHANG; MAZZOTTI; MORBIDELLI, 2004). Uma das principais características para o sucesso das técnicas cromatográficas, no que diz respeito à síntese assimétrica de enantiômeros puros em escala preparativa, é a possibilidade de desenvolver a separação em tempos relativamente curtos (FRANCOTTE et al., 1998). Um sistema LMS é essencialmente um separador binário, particularmente apropriado para separações quirais. Antecipando brevemente, a cromatografia em LMS permite a alimentação e separação

contínua de misturas binárias. A simulação de um contato contracorrente entre as fases sólida e líquida maximiza o transporte de massa, levando a uma redução significativa no consumo de fases móvel e estacionária, quando comparado à cromatografia convencional em batelada (RODRIGUES; PAIS, 2004).

As vantagens do emprego do LMS frente à cromatografia em batelada, podem ainda ser ampliadas nos quesitos que seguem (SCHULTE; STRUBE, 2001):

- Maior produtividade,
- Menor custo de operação,
- Produtos mais concentrados.

Mesmo em separações em escala de produção, onde o baixo custo de operação supera o alto custo fixo, o custo global de separação de um LMS é menor que na cromatografia em batelada (ZHANG; MAZZOTTI; MORBIDELLI, 2004).

Para explicar o funcionamento de um sistema de cromatografia contínua do tipo LMS será utilizado um sistema equivalente chamado Leito Móvel Verdadeiro (LMV) (COX, 2005). Neste, há um movimento real contracorrente entre a fase móvel líquida e a fase sólida adsorvente. A Figura 2.8 esquematiza este processo, que é dividido em 4 seções, cada uma consistindo em uma coluna com material adsorvente. A alimentação é continuamente injetada no meio do sistema e duas correntes de produtos são coletadas: o *extrato*, rico no componente mais retido à fase estacionária e preferencialmente arrastado com a fase sólida, e o *refinado*, rico na espécie menos retida, que se move com a fase líquida (RODRIGUES; PAIS, 2004). Consideremos a alimentação de uma mistura binária em que a espécie mais retida *B* e a espécie menos retida *A* são dissolvidos no(s) solvente(s) da fase móvel *S*.

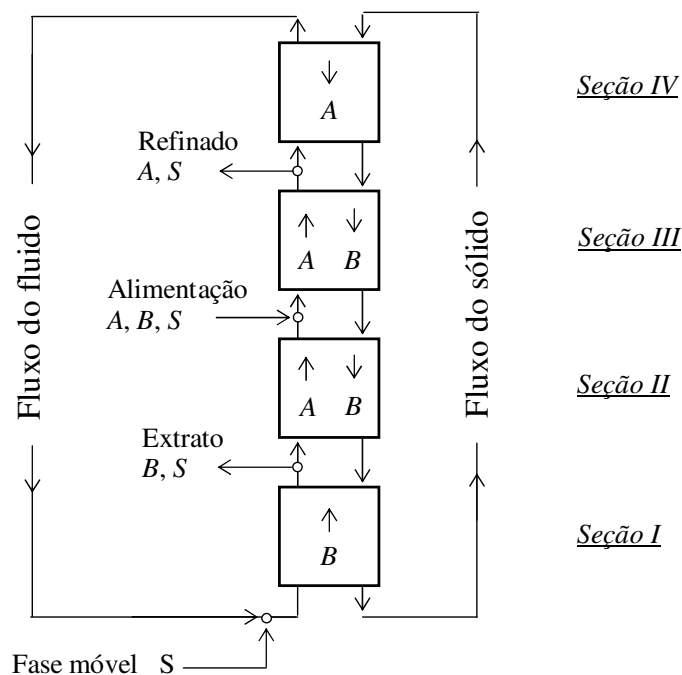


Figura 2.8. Esquema das quatro seções de uma unidade Leito Móvel Verdadeiro (LMV) em uma separação binária, sendo o componente B mais retido, A o menos retido e S a fase móvel.

Sendo as interações de A e B para com a fase sólida diferentes ($B > A$), é possível escolher vazões para fazer B movimentar-se para baixo e A movimentar-se para cima, conduzindo a uma separação espacial. Nas seções II e III, de acordo com o esquema apresentado na Figura 2.8, a separação se processa de forma que B é adsorvido enquanto A é eluído. Na seção I, B é dessorvido e a fase sólida é regenerada, enquanto na seção IV, B é adsorvido e a fase móvel é limpa, podendo ser reciclada na seção I. Desta forma, B é coletado no extrato e A no refinado (GIOVANNI, 2000). Este sistema requer duas linhas de entrada, uma para a alimentação da amostra (A e B) e outra para o dessorvente (fase móvel); e duas linhas de retirada, uma para o refinado A e outra para o extrato B . Devido aos pontos de alimentação e retirada, as vazões de líquido diferem de uma seção para outra, levando as quatro seções da unidade a cumprirem funções diferentes (RODRIGUES; PAIS, 2004).

Pode-se perceber que o movimento da fase sólida adsorvente se faz necessário, e isto não pode ser realizado na prática sem considerável redução de eficiência do processo.

A movimentação do sólido também leva à erosão das partículas e a problemas de atrito (SILVA; MINCEVA; RODRIGUES, 2004). Para vencer este obstáculo lança-se mão do LMS. Uma técnica desenvolvida para manter as vantagens do processo contínuo contracorrente sem introduzir os problemas associados com o movimento da fase sólida (RODRIGUES; PAIS, 2004). O LMS consiste no arranjo de várias colunas de leito fixo, tal como representado na Figura 2.9, em que o processo contracorrente entre as fases sólida e líquida é simulado por mudanças periódicas das posições de entrada e saída na direção da fase líquida. Desta forma, a fase sólida não se move e perfis de concentração são alcançados no interior de cada coluna. Tão logo os pontos de alimentação e retirada seguem estes perfis, pode-se gerar um estado estacionário cíclico, em que, a migração das frentes de adsorção se repete a cada tempo de troca da mesma forma (GIOVANNI, 2000).

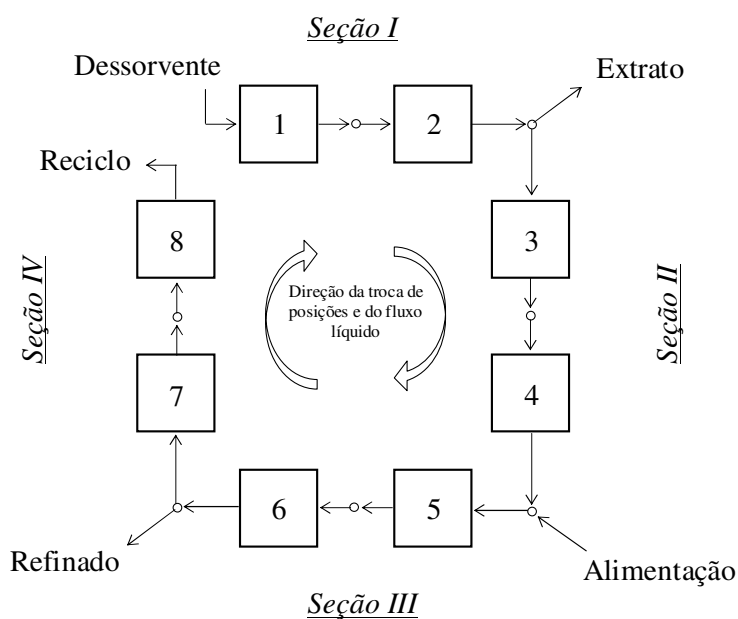


Figura 2.9. Esquema das quatro seções de uma unidade Leito Móvel Simulado (LMS) de configuração 2-2-2-2 para separação contínua [adaptado de Migliorini, Mazzotti e Morbidelli (1998)].

Na Figura 2.9 está esquematizado um sistema cromatográfico contínuo com 8 colunas, cuja configuração é 2-2-2-2, ou seja, 2 colunas por seção. No entanto, esta configuração pode variar para cada sistema e apresentar não necessariamente o mesmo

número de colunas por seção. Um exemplo que pode ser citado é a configuração 5-1-3-3 descrita por Mazzotti, Storti e Morbidelli (1997a).

Aplicações industriais do LMS apresentam-se em diferentes escalas de produção. Sua tecnologia foi desenvolvida em 1966 pela UOP (*Universal Oil Products*), recebendo o nome genérico de *Sorbex* (CHING; RUTHVEN, 1985), para separação em larga escala de hidrocarbonetos em plantas com capacidade de produção superior a 10000 toneladas por ano. A maioria das unidades licenciadas até 2000 era utilizada para separação do *p*-xileno a partir de frações de alquil aromáticos usando zeólitas Y como adsorvente e tolueno ou *p*-dietilbenzeno como dessorvente (JUZA; MAZZOTTI; MORBIDELLI, 2000; GIOVANNI, 2000; RUTHVEN; CHING, 1989).

Misturas multicomponentes também podem ser separadas pelo processo LMS. Assim como no caso de mistura binária, a unidade distribui os componentes nas correntes de extrato e refinado, de acordo com as interações dos mesmos com o sólido adsorvente. A separação se dá de forma que os componentes com maior interação ou igual a do componente de interesse são coletados na corrente de extrato, e aqueles com menor interação são coletados na corrente de refinado (MAZZOTTI; STORTI; MORBIDELLI, 1994).

2.14.1. Projeto das condições de operação do LMS

A seleção das condições operacionais do LMS não é direta. O principal problema consiste na escolha correta das vazões de sólido (representadas pelo tempo de troca das posições de alimentação e retirada) e líquido (RODRIGUES; PAIS, 2004). Deve-se ter em mãos estes parâmetros antes mesmo da partida da unidade. Nisto estão inseridos a determinação das vazões de alimentação da amostra e de dessorvente e as vazões de retirada de refinado e extrato, além o tempo de troca das posições das correntes no sistema.

Projetadas para obter alta produtividade de separação, as unidades LMS muitas vezes operam com alta concentração de alimentação, o que leva a comportamentos não lineares na adsorção competitiva dos enantiômeros. Por isso, ferramentas de modelagem e simulação são de importância crucial antes da realização de experimentos no sistema. A

modelagem de um processo de separação em LMS pode ser analisada por duas estratégias diferentes: uma, pela simulação do sistema diretamente, levando em conta o comportamento transiente; e outra pela representação de sua operação em termos de um sistema LMV (Leito Móvel Verdadeiro) que, de acordo com sua modelagem, avalia o estado estacionário do processo. O primeiro modelo representa o LMS real e considera as trocas periódicas dos pontos de alimentação e coleta. O segundo é desenvolvido assumindo a equivalência com o LMV, em que as fases sólida e fluida fluem em direções opostas (RODRIGUES; PAIS, 2004).

A *Teoria do Equilíbrio*, que se enquadra no segundo caso mencionado, pode ser usada para a determinação dos parâmetros de operação da unidade (FRANCOTTE et al., 1998; MIGLIORINI; MAZZOTTI; MORBIDELLI, 1998). Esta base teórica desconsidera os efeitos causados pela dispersão axial, resistências à transferência de massa, e ainda assume que o equilíbrio de adsorção é estabelecido em toda coluna a todo instante (MAZZOTTI; STORTI; MOBIDELLI, 1997a). Por isso faz uso de um modelo matemático simplificado (modelo ideal) (SANTOS, 2004).

Para determinar o regime estacionário de uma unidade LMS é necessário um modelo dependente do tempo, enquanto que para uma unidade LMV é necessário um modelo que não dependa do tempo. Considerando as configurações destas unidades equivalentes, o modelo para a unidade LMV é mais simples e pode ser usado para prever o desempenho da separação no estado estacionário da unidade LMS, desde que atenda às Equações 2.31 e 2.32 (MAZZOTTI; STORTI; MOBIDELLI, 1997a).

$$(Q_j)_{LMS} = (Q_j)_{LMV} + \frac{\varepsilon}{1-\varepsilon} \cdot Q_s \quad (2.31)$$

$$\frac{V}{t^*} = \frac{Q_s}{1-\varepsilon} \quad (2.32)$$

Definindo o parâmetro m_j como a razão entre as vazões efetivas de líquido e de sólido na seção j de uma unidade LMV, tem-se a Equação 2.33 (MAZZOTTI; STORTI; MOBIDELLI, 1997a; MAZZOTTI; STORTI; MOBIDELLI, 1997b):

$$m_j = \frac{(Q_j)_{LMV} - Q_S \cdot \varepsilon_P}{Q_S (1 - \varepsilon_P)} \quad (2.33)$$

Partindo da Equação 2.33 e atendendo as regras de equivalência impostas pelas Equações 2.31 e 2.32, define-se o parâmetro m_j para uma unidade LMS de acordo com a Equação 2.34.

$$m_j = \frac{(Q_j)_{LMS} \cdot t^* - V_c \cdot \varepsilon_T}{V_c (1 - \varepsilon_T)} \quad (2.34)$$

Nas equações mencionadas, Q_S é a vazão volumétrica de sólido na unidade LMV, t^* o tempo de troca das posições, V_c o volume da coluna, ε_T a porosidade total da coluna [$\varepsilon_T = \varepsilon + \varepsilon_P(1 - \varepsilon)$].

Observando a unidade LMV mostrada na Figura 2.8, pode-se dizer, em cada seção, qual a direção que cada componente deve obedecer, acompanhando o líquido ou o sólido, em função do papel que cada seção exerce na separação (SANTOS, 2004).

Na seção I, e apenas nela, o componente mais fortemente adsorvido B acompanha o líquido até ser extraído na corrente de extrato. O componente menos adsorvido A deve se encontrar em quantidade muito pequena nesta seção para não poluir a corrente de extrato, devendo ser arrastado pelo sólido na seção IV. Desta forma, sendo $n_{i,j}$ e $c_{i,j}$ o fluxo mássico efetivo e a concentração do componente i ($i = A, B$), respectivamente, na seção j ($j = I, \dots, IV$), tem-se:

$$m_I > \frac{n_{B,I}}{c_{B,I}} \quad (2.35)$$

Na seção II o componente B acompanha o sólido até sua saída na corrente de extrato, enquanto o componente A acompanha o líquido e tem sua saída na corrente de refinado. Com isso tem-se que:

$$\frac{n_{A,2II}}{c_{A,II}} < m_{II} < \frac{n_{B,II}}{c_{B,II}} \quad (2.36)$$

A direção que cada componente deve obedecer na seção III é idêntica à da seção II, com *A* acompanhando o líquido e *B* o sólido, logo:

$$\frac{n_{A,III}}{c_{A,III}} < m_{III} < \frac{n_{B,III}}{c_{B,III}} \quad (2.37)$$

Na seção IV o componente menos adsorvido *A* acompanha o sólido. Isto ocorre apenas nesta seção, para que o dessorvente possa ser regenerado, com isso:

$$m_{IV} < \frac{n_{A,IV}}{c_{A,IV}} \quad (2.38)$$

Considerando o caso de um sistema cujo equilíbrio termodinâmico é representado por uma isoterma de equilíbrio linear, situação válida para soluções diluídas, a adsorção obedece à lei de Henry de acordo com a Equação 2.39 (MAZZOTTI; STORTI; MOBIDELLI, 1997a).

$$n_i = He_i \cdot c_i \quad (2.39)$$

Substituindo a Equação 2.39 nas Equações 2.35 a 2.38, chegam-se às seguintes condições:

$$m_I > He_{B,I} \quad (2.40)$$

$$He_{A,II} < m_{II} < He_{B,II} \quad (2.41)$$

$$He_{A,III} < m_{III} < He_{B,III} \quad (2.42)$$

$$m_{IV} < He_{A,IV} \quad (2.43)$$

As seções II e III da unidade LMV exercem um papel fundamental no desempenho da separação. Se a alimentação entre estas duas seções acompanhar o fluxo líquido, isso implica que $m_{III} > m_{II}$ e as condições dadas pelas Equações 2.41 e 2.42 podem ser agrupadas, gerando a Equação 2.44.

$$He_{A,II} < m_{II} < m_{III} < He_{B,III} \quad (2.44)$$

Estas equações definem uma região no espaço em quatro dimensões medida pelos parâmetros de operação m_j , cujos pontos correspondem às condições operacionais em que a teoria do equilíbrio garante a completa separação dos componentes (MAZZOTTI; STORTI; MOBIDELLI, 1997b). Nota-se que estas condições são independentes da composição da alimentação, isto é válido desde que seja mantida a situação de alta diluição.

Do ponto de vista físico, o significado das condições impostas pelas Equações 2.41 e 2.42 é que os parâmetros operacionais m_{II} e m_{III} devem ser grandes suficientes para que o componente *A* seja arrastado para a corrente de refinado, mas por outro lado eles também devem ser pequenos para garantir que o componente *B* vá até a corrente de extrato. As restrições para m_I e m_{IV} impõem que ambos componentes são eluídos na seção I pela fase móvel e retidos na seção IV na fase sólida (MAZZOTTI; STORTI; MOBIDELLI, 1997b).

As condições impostas pela Equação 2.44 definem a região de completa separação sobre o plano (m_{II}, m_{III}) representada pelo triângulo retângulo (Método do Triângulo) destacado na Figura 2.10, na qual foi considerada a isoterma de adsorção linear dada pela Equação 2.39, em que $He_B = 3$ e $He_A = 1$. Desta forma, valores de m_{II} e m_{III} resultantes do interior deste triângulo proporcionam vazões nas correntes de extrato e refinado de forma que estas correntes estejam com alto grau de pureza de cada enantiômero.

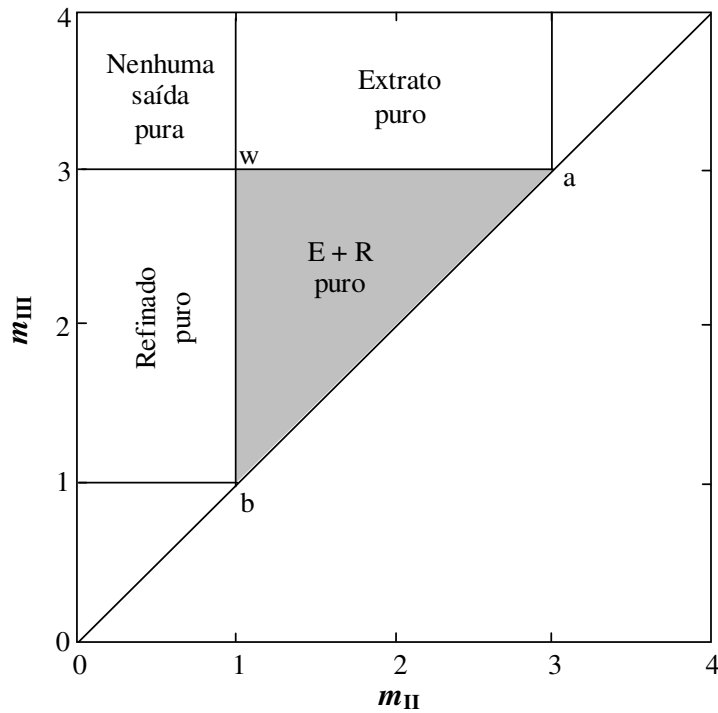


Figura 2.10. Regiões do plano (m_{II} , m_{III}) com diferentes regimes de separação em termos da pureza das correntes de saída, para um sistema descrito por uma isoterma de adsorção linear: $He_B = 3$; $He_A = 1$ [reproduzido de Mazzotti, Storti e Morbidelli (1997a)].

A determinação das vazões em cada corrente do sistema pode ser determinada facilmente por meio de um balanço de massa em cada nó. Isto pode ser melhor visualizado na Figura 2.9. As vazões nas correntes de extrato, refinado e da alimentação são então calculados de acordo com as Equações 2.45 a 2.47.

$$Q_E = Q_I - Q_{II} \quad (2.45)$$

$$Q_R = Q_{III} - Q_{IV} \quad (2.46)$$

$$Q_A = Q_{III} - Q_{II} \quad (2.47)$$

Modelos não ideais levam em conta os efeitos de transferência de massa e não linearidades do processo termodinâmico de adsorção. Com isso, a região de completa separação, baseada na teoria do equilíbrio (método do triângulo) com modelo ideal, sofre uma redução e pode variar sua projeção dependendo dos fenômenos considerados. Esses modelos tendem a certificar uma região de maior confiabilidade para a separação dos enantiômeros, uma vez que considera efeitos que são pronunciados em uma operação real do sistema LMS.

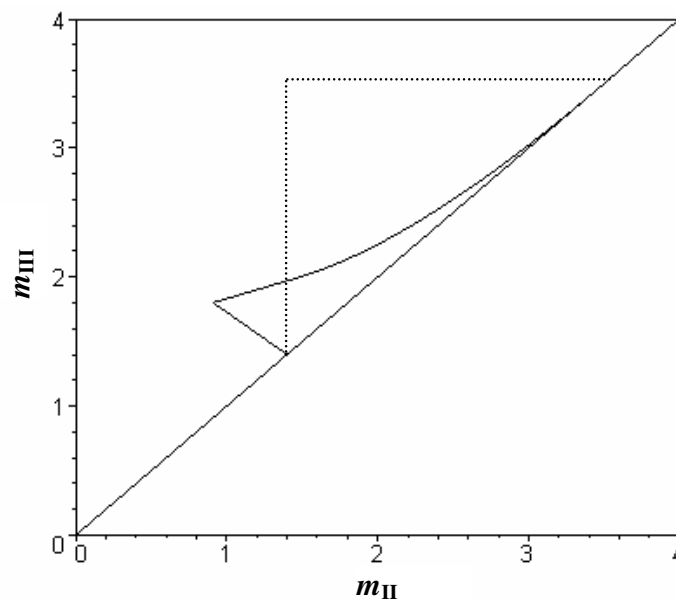


Figura 2.11. Região de completa separação para uma mistura binária descrita por uma isoterma de adsorção multicomponente. $He_B = 3,5$; $He_A = 1,4$; $b_B = 0,0550$ L/g; $b_A = 0,0135$ L/g; $c_{A,alim.} = c_{B,alim.} = 15$ g/L. As linhas pontilhadas correspondem à região de completa separação para sistema linear com as mesmas constantes de Henry [reproduzido de Francotte et al. (1998)].

A Figura 2.11 mostra o comportamento típico de uma região de completa separação em que o sistema é descrito por uma isoterma de equilíbrio de adsorção Langmuir multicomponente. Para este caso têm-se os seguintes dados: $He_B = 3,5$; $He_A = 1,4$; $b_B = 0,0550$ L/g; $b_A = 0,0135$ L/g; $c_{A,alim.} = c_{B,alim.} = 15$ g/L.

A linha pontilhada da Figura 2.11 corresponde à região de completa separação para o caso de isotermas de adsorção lineares. Para o caso não-linear a região é mais restrita e deslocada.

2.14.2. Modelagem matemática para o LMS

O modelo matemático para o LMS é formado pelo sistema de Equações Diferenciais Parciais (EDP), descrito pelas Equações 2.48 a 2.56, seguindo o modelo de equilíbrio dispersivo. Tais equações são apresentadas na forma adimensional e representam balanços de massa microscópicos no interior das colunas e balanços de massa macroscópicos em cada nó (AZEVEDO; RODRIGUES, 1999). Os balanços de massas nas fases fluida e sólida, por componente em cada coluna, ficam de acordo com as Equações 2.48 e 2.49, respectivamente.

$$\frac{\partial c_{ij}}{\partial t} = \gamma_j \left[\frac{1}{Pe_{ij}} \frac{\partial^2 c_{ij}}{\partial x^2} - \frac{\partial c_{ij}}{\partial x} \right] + \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \alpha_j (q_{ij}^* - \langle q_{ij} \rangle) \quad (2.48)$$

$$\frac{d\langle q_{i,j} \rangle}{dt} = -\alpha_j [q_{i,j}^* - \langle q_{i,j} \rangle] \quad (2.49)$$

As condições iniciais e de contorno são:

$$c_{ij}(x,0) = c_{ij}^{inicial}(x) \quad e \quad q_{ij}(x,0) = q_{ij}^{inicial}(x) \quad (2.50)$$

$$x = 0, \quad q_{ij,0} = c_{ij-1,1} \quad e \quad q_{i4,0} = c_{i1,1} \quad (2.51)$$

$$x = 0, \quad \frac{\partial c_{ij}}{\partial x} = Pe_{ij} (c_{ij} - c_{ij}^{A\lim}) \quad (2.52)$$

$$x = 1, \quad \frac{\partial c_{ij}}{\partial x} = 0 \quad (2.53)$$

Desprezando os efeitos extracoluna, balanços de massa nos nós são representados por:

$$j = 1 \quad (\text{nó do dessorvente}): \quad c_{ij}^{A\text{lim}} = 0 \quad (2.54)$$

$$j = 3 \quad (\text{nó da alimentação}): \quad c_{i,III}^{A\text{lim}} = \frac{Q_{A\text{lim}}}{Q_{III}} c_i^{A\text{lim}}(t) + \frac{Q_{II}}{Q_{III}} c_{ij-1}(x=1, t) \quad (2.55)$$

$$\text{Demais nós:} \quad c_{ij}^{A\text{lim}} = c_{ij-1}(x=1, t) \quad (2.56)$$

O sistema de EDP's formado é resolvido pelo método das linhas. No qual, as equações são discretizadas na variável axial (x) e integradas na variável tempo (t). Os métodos de discretização empregados correspondem ao método de volumes finitos com função de interpolação do tipo upwind quadrática (BARRETO JR, 2005) e função de interpolação adaptativa (MALISKA, 2004). As Equações Algébricas Discretizadas (EAD's) resultantes são integradas empregando o método *Backward Differentiation Formulae* (BDF), a partir da utilização do pacote computacional *Dassl*. O sistema é inicializado empregando um método direto utilizando funções exponenciais de regularização, com parâmetro de regularização igual a 10^{-4} , de acordo com Vieira e Biscaia Jr (2000).

2.14.3. Modelagem matemática para o LMV

Neste tópico será apresentada a modelagem matemática proposta para o processo LMS, baseado na analogia deste com o LMV. As principais considerações são: (i) dispersão axial para a fase líquida, (ii) fluxo empistonado para a fase sólida, (iii) força

motriz linear para taxa de transferência de massa intrapartícula e (iv) operação isotérmica (LEÃO; RODRIGUES, 2004).

As equações adimensionais para o balanço de massa em um elemento de volume de uma seção do LMV, para a fase fluida e para as partículas adsorventes, após a introdução da variável adimensional espaço, $x = z/L_j$, em que L_j é o comprimento da seção, são dadas pelas Equações 2.57 e 2.58, respectivamente.

$$\frac{d^2 c_{i,j}}{dx^2} = Pe_j \frac{dc_{i,j}}{dx} + \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \frac{Pe_j}{\gamma_j} \alpha_j [q_{i,j}^* - \langle q_{i,j} \rangle] \quad (2.57)$$

$$\frac{d\langle q_{i,j} \rangle}{dx} = -\alpha_j [q_{i,j}^* - \langle q_{i,j} \rangle] \quad (2.58)$$

A isoterma de equilíbrio de adsorção representando a lei de equilíbrio entre as concentrações nas fases líquida e adsorvente, na interface líquido/sólido, é dada pela relação linear tal como a Equação 2.59.

$$q_{i,j}^* = K_{P,i} c_{i,j} \quad (2.59)$$

Este modelo consiste em um sistema misto de equações diferenciais (2.57 e 2.58) e algébricas (2.59). As condições de contorno são:

$$x = 0, \quad c_{ij,0} = c_{ij} - \frac{1}{Pe_j} \frac{dc_{ij}}{dx} \quad (2.60)$$

$$x = 1, \quad \frac{dc_{ij}}{dx} = 0 \quad e \quad \langle q_{ij} \rangle = \langle q_{ij+1,0} \rangle \quad (2.61)$$

Os subscritos $i = A, B$ referem-se aos compostos menos retido e mais retido e, $j = I, \dots, IV$ referem-se ao número de seções da unidade; c_{ij} e $\langle q_{ij} \rangle$ são, respectivamente, as concentrações nas fases líquida e adsorvente (no caso do adsorvente é a concentração média), para o componente i na seção j do LMV; $K_{p,i}$ é a constante de equilíbrio para o componente i ; ε é a porosidade do leito; t a variável tempo; u_j e u_s as velocidades intersticiais do líquido e do sólido; $D_{L,j}$ o coeficiente de dispersão axial na seção j .

Os balanços de massa nos nós acoplados às Equações 2.57 e 2.58 são:

$$j = 1 \quad (\text{nó do dessorvente}): \quad c_{iI,0} = \frac{Q_{IV}}{Q_I} c_{iIV,L_{IV}} \quad (2.62)$$

$$j = 2 \quad (\text{nó da saída de extrato}): \quad c_{iII,0} = c_{iI,L_I} \quad (2.63)$$

$$j = 3 \quad (\text{nó da alimentação}): \quad c_{iIII,0} = \frac{Q_{II}}{Q_{III}} c_{iII,L_{II}} + \frac{Q_{A\text{lim}}}{Q_{III}} c_i^{A\text{lim}} \quad (2.64)$$

$$j = 4 \quad (\text{nó da saída de refinado}): \quad c_{iIV,0} = c_{iIII,L_{III}} \quad (2.65)$$

Nestas equações Q_j é a vazão através da seção j e $c_i^{A\text{lim}}$ é a concentração de alimentação do componente i . Os parâmetros adimensionais do modelo são apresentados na Tabela 2.1.

As Equações 2.57 a 2.65 são discretizadas usando a mesma metodologia aplicada a discretização do modelo do LMS. O sistema de equações algébricas não-lineares resultante é resolvido usando o método de Newton, aplicando uma rotina do IMSL. A solução deste modelo matemático gera perfis estacionários de concentração de cada substância no interior do LMV. Tais informações são fundamentais para a avaliação das influências nos parâmetros m_j e concentração de alimentação no comportamento da produtividade, do consumo de solvente e recuperação, atendendo restrições de pureza e limites físicos para as variáveis de desempenho.

Tabela 2.1. Parâmetros adimensionais do modelo.

$\alpha_j = kL_j/u_S$	Número de unidades de transferência de massa em uma seção LMV
$Pe_j = u_jL_j/D_{Lj}$	Número de <i>Peclet</i>
$\gamma_j = u_j/u_S$	Razão entre as velocidades do fluido e sólido na seção <i>j</i>
$(1 - \varepsilon)/\varepsilon$	Razão entre os volumes de sólido e fluido

2.14.4. Variáveis de desempenho

As variáveis de desempenho avaliadas em uma determinada condição, simulada pelos modelos descritos, foram calculadas de acordo com as equações apresentadas na Tabela 2.2.

Tabela 2.2. Variáveis de desempenho avaliadas no processo.

<i>Variável desempenho</i>	<i>Extrato</i>	<i>Refinado</i>
<i>Pureza (P)</i>	$\frac{100 \cdot c_{B,E}}{c_{A,E} + c_{B,E}}$	$\frac{100 \cdot c_{A,R}}{c_{A,R} + c_{B,R}}$
<i>Produtividade (Pr)</i>	$\frac{Q_E \cdot c_{B,E}}{V_{ads}}$	$\frac{Q_R \cdot c_{B,R}}{V_{ads}}$
<i>Recuperação (Rec)</i>	$\frac{100 \cdot c_{B,E} \cdot Q_E}{c_{B,Alim} \cdot Q_{B,Alim}}$	$\frac{100 \cdot c_{A,R} \cdot Q_R}{c_{A,Alim} \cdot Q_{A,Alim}}$
<i>Consumo de solvente (CS)</i>	$\frac{Q_I + Q_{Alim}}{c_T \cdot Q_{Alim}}$	$\frac{Q_I + Q_{Alim}}{c_T \cdot Q_{Alim}}$

Capítulo 3

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O Capítulo 3 apresenta as principais características dos materiais utilizados nos experimentos, juntamente com o aparato instrumental. Há a descrição da metodologia experimental para a escolha da fase eluente de trabalho e da faixa de comprimento de onda admitida. Na seqüência, para melhor visualizar as etapas experimentais, a metodologia experimental se dividirá em dois tópicos: 1) experimentos com soluções diluídas: para a caracterização das colunas cromatográficas e obtenção dos parâmetros de separação e de equilíbrio de adsorção e, 2) experimentos com soluções concentradas: com o intuito de estudar o comportamento da coluna com a elevação da concentração, obter as isotermas de adsorção e realizar uma separação dos enantiômeros em batelada.

3.1. MATERIAIS

3.1.1. *O rolipram*

Parte dos experimentos foi realizada com a mistura enantiomérica do rolipram sintetizada no Laboratório de Síntese Orgânica do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas. Outra parte do rolipram, principalmente a utilizada na determinação das isotermas de adsorção, foi adquirida junto à Tocris (EUA).

3.1.2. Fase estacionária quiral

As colunas empacotadas com a FEQ apresentada no Capítulo 2 são comercialmente conhecidas por Kromasil[®] CHI-TBB e são produzidas pela empresa EKA Chemical (Suécia). Utilizou-se no trabalho colunas preparativas de aço inoxidável com 25 cm de comprimento e 1 cm de diâmetro, contendo a fase estacionária quiral com diâmetro médio de partícula igual a 16 µm.

3.1.3. Aparelhagem experimental

Os experimentos cromatográficos foram realizados em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com bombas modelo 1525, detector UV-VIS com dois canais de detecção modelo 2487, injetor manual modelo 7725i, todos da Waters (EUA). O forno era acoplado ao sistema e também da Waters (EUA). O sistema de aquisição de dados foi computadorizado (software BREEZE). Experimentos de varreduras foram realizados em espectrofotômetro UV-VIS modelo DU640 da Beckman (EUA). As amostras de rolipram, bem como a fase móvel, foram mantidas em banho ultra-sônico modelo 3510 da Branson (EUA). O rolipram foi pesado em balança analítica da Quimis (Brasil). A remoção da umidade do rolipram foi procedida em estufa modelo 515 da Fanem (Brasil). A ordem de eluição dos enantiômeros foi verificada em um detector baseado em dicroísmo circular e UV-VIS modelo CD-2095 Plus da Jasco (Japão). Estes dados foram capturados por sistema computadorizado com software da Shimadzu CLASS-VP (Japão).

3.1.4. Solventes

Os solventes utilizados para a composição da fase móvel e preparo das amostras, foram: acetato de etila 99,9%; n-hexano 95% (Mallinckrodt, EUA), metil-*terc*-butiléter 99%, etanol 99,9%, e 2-propanol 100% (J. T. Backer, EUA), todos grau cromatográfico.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Experimentos preliminares

Definição e otimização da fase móvel

Este estudo foi realizado com diferentes combinações de solventes em diferentes proporções, com a finalidade de descobrir qual dessas combinações representaria melhor a fase móvel para a posterior análise da separação da mistura enantiomérica. Os solventes disponíveis eram: hexano, etanol (EtOH), 2-propanol, metil-*terc*-butiléter (MTBE) e acetato de etila (EtOAc).

Fizeram-se injeções de 20 μ L da amostra, a uma concentração total dos enantiômeros de 0,15 mg/mL. O valor de λ programado no sistema de detecção foi 270 nm. A fase móvel eluiu a uma vazão de 2,00 mL/min.

Avaliação da resposta do sistema de detecção

Para verificar uma faixa de comprimento de onda (λ) a ser trabalhada nos experimentos, fez-se uma varredura em espectrofotômetro UV-VIS. O equipamento foi calibrado com a solução contendo apenas a fase móvel metil *terc*-butiléter/acetato de etila/etanol (60/35/5, v/v). Na seqüência foi realizada a varredura entre 240 e 300 nm. A amostra contendo rolipram apresentava concentração total de 0,15 mg/mL.

Determinação da ordem de eluição

A ordem de eluição dos enantiômeros foi definida por meio da injeção de 200 μ L de uma solução de rolipram na forma racêmica em concentração total de 0,15 mg/mL e a uma vazão de 2,00 mL/min de fase móvel composta por metil *terc*-butiléter/acetato de etila/etanol (60/35/5, v/v). O sistema de análise foi ajustado em 270 nm.

3.2.2. Experimentos com soluções diluídas

Determinação da porosidade total

Experimentos de pulsos cromatográficos com o composto 1,3,5-tri-*tert*-butilbenzeno (TTBB) (Aldrich Chemical Co, EUA), cuja estrutura molecular está apresentada na Figura 3.1, foram realizados com a finalidade de verificar a homogeneidade do empacotamento das colunas e determinar a porosidade total (ε_T) das mesmas. O TTBB é uma molécula relativamente pequena (MM: 264,44 g/gmol) e não é retida na FEQ, sendo capaz de se difundir não somente através do leito, mas também nos interstícios das partículas do sólido poroso. Este composto tem sido amplamente utilizado na determinação da ε_T para vários tipos de FEQs (SILVA JR et al., 2005; SANTOS et al., 2004; WANG; CHING, 2002; DUAN; CHING; SWARUP, 1998).

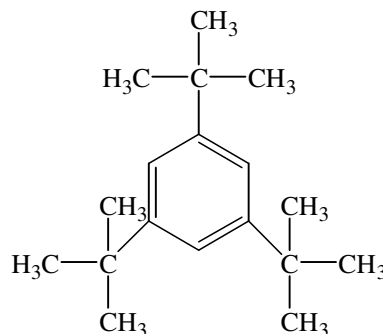


Figura 3.1. Estrutura molecular do composto 1,3,5-tri-*tert*-butilbenzeno (TTBB).

A temperatura do sistema foi mantida constante e igual à 25°C. As respostas dos pulsos cromatográficos com TTBB em concentração de 1,50 mg/mL foram monitoradas pelo detector UV-VIS no comprimento de onda 270 nm, sendo que a fase móvel eluia com vazão de 2,00 mL/min. O valor da porosidade total foi determinado de acordo com a Equação 3.1.

$$\varepsilon_T = \frac{t_0 \cdot Q}{V_C} \quad (3.1)$$

Na Equação 3.1, t_0 é o tempo de residência do TTBB na coluna, Q é a vazão da fase móvel e V_C representa o volume da coluna.

Determinação da porosidade do leito e da partícula

A determinação da porosidade do leito foi baseada no método dos momentos para isotermas lineares. Foram realizadas injeções de 20 μL do composto poliestireno (Polymer Laboratories, Reino Unido) em concentração 0,5 mg/mL. Por não sofrer interações com a fase estacionária e devido sua elevada massa molecular (MM: 504500 g/gmol), ele é capaz de se difundir pela coluna cromatográfica passando apenas nas regiões entre as partículas, não adentrando em seus poros. A estrutura do poliestireno é apresentado na Figura 3.2.

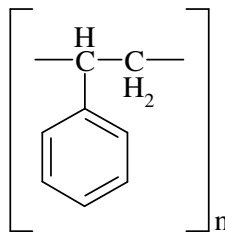


Figura 3.2. Estrutura molecular do composto poliestireno.

O tempo de retenção do poliestireno na temperatura de 25°C nas vazões 1,00; 2,00; 3,00 e 4,00 mL/min permitiram a construção da curva do primeiro momento (μ) por L/u_0 , cuja inclinação fornece diretamente o valor da porosidade do leito (ϵ).

Por meio da Equação 3.2, que provém das definições das porosidades, estima-se o valor da porosidade da partícula (ϵ_p).

$$\epsilon_T = \epsilon + (1 - \epsilon) \cdot \epsilon_p \quad (3.2)$$

Determinação das constantes de equilíbrio de adsorção

Variou-se a vazão de alimentação da fase móvel entre 1,00 e 4,00 mL/min com passos de 1,00 mL/min. Para cada vazão foram realizadas injeções de 20 μ L de amostra de rolipram em concentração total 0,15 mg/mL. O sistema de análise foi ajustado a 270 nm. Por se tratar de solução diluída, de acordo com o método dos momentos, μ corresponde ao tempo de retenção de cada enantiômero. A inclinação da reta no gráfico de μ por L/u_0 permite calcular indiretamente o valor da constante de adsorção K_P para os enantiômeros.

Determinação das constantes de Henry e parâmetros analíticos de separação

Para a obtenção das constantes de Henry (He), foram realizados experimentos de pulsos cromatográficos com a mistura enantiomérica. Seus valores foram determinados a partir dos tempos de retenção dos enantiômeros do rolipram ($t_{R,i}$) e do composto inerte TTBB (t_0), de acordo com a Equação 3.3. A fase móvel passava através da coluna a uma vazão de 2,00 mL/min.

$$He_i = \left(\frac{t_{R,i} - t_0}{t_0} \right) \frac{\epsilon_T}{1 - \epsilon_T} \quad (3.3)$$

Comumente define-se o primeiro termo do produto como fator de retenção (k_i) dos enantiômeros e se expressa de acordo com a Equação 3.4.

$$k_i = \left(\frac{t_{R,i} - t_0}{t_0} \right), i = 1 \text{ e } 2. \quad (3.4)$$

O fator de separação do sistema (α) pode ser determinado a partir dos fatores de retenção, conforme a Equação 3.5, em que, 1 é o enantiômero menos retido e 2 o mais retido.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (3.5)$$

A razão entre as constantes de Henry para os enantiômeros mais retido e menos retido também pode ser alternativamente utilizada para o cálculo de α . Isso pode ser observado substituindo-se a Equação 3.4 na 3.5 e multiplicando-se o numerador e o denominador da equação resultante pelo termo $\varepsilon_T / (1 - \varepsilon_T)$, resultando na Equação 3.6.

$$\alpha = \frac{\left(\frac{t_{R,2} - t_0}{t_0} \right) \frac{\varepsilon_T}{1 - \varepsilon_T}}{\left(\frac{t_{R,1} - t_0}{t_0} \right) \frac{\varepsilon_T}{1 - \varepsilon_T}} = \frac{He_2}{He_1} \quad (3.6)$$

Um parâmetro analítico muito importante é a resolução (R_S), calculada a partir da relação entre as diferenças entre os tempos de retenção dos enantiômeros e a largura dos picos de eluição a meia altura, de acordo com a Equação 3.7. O fator de assimetria (As) foi determinado pela medida das proporções entre as duas partes do pico cromatográfico medidos horizontalmente a 10% de sua altura, de acordo com a Equação 3.8. A Figura 3.3 trata-se de um perfil de eluição cromatográfico indicando o tempo de retenção do composto e as alturas correspondentes a 10% e 50% da altura do pico.

$$R_S = 1,177 \frac{(t_{R,2} - t_{R,1})}{(w_{h,1} + w_{h,2})} \quad (3.7)$$

$$As_i = \frac{b}{a} \quad (3.8)$$

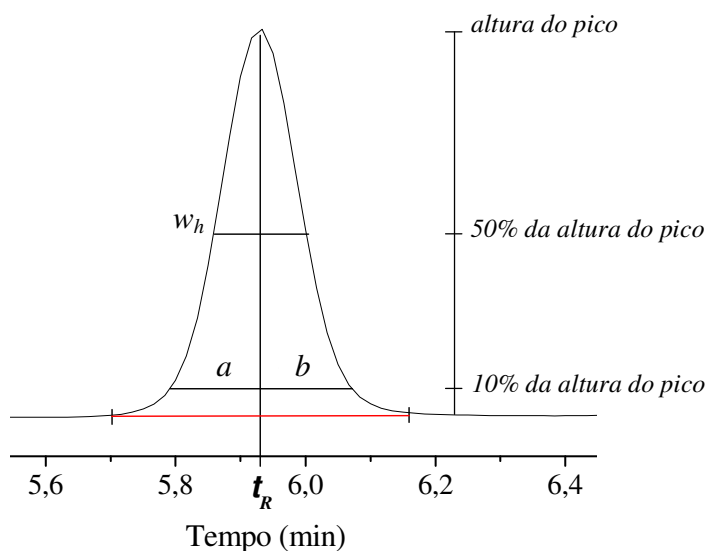


Figura 3.3. Representação de um perfil de eluição indicando o tempo de retenção (t_R), 10% e 50% da altura do pico cromatográfico. (—) linha de base.

Caracterização das colunas cromatográficas do sistema LMS

O sistema LMS possui 8 colunas cujas porosidade total, constantes de equilíbrio e parâmetros de separação, foram determinados pela técnica de pulsos cromatográficos, sob condições isocráticas, a uma vazão de 2,00 mL/min, utilizando-se soluções diluídas dos enantiômeros e do composto inerte TTBB. As colunas apresentavam dimensões de 25 cm de comprimento e 1 cm de diâmetro interno. O detector foi programado para fazer as leituras em 270 nm.

3.2.3. Experimentos com soluções concentradas

Estudo de sobrecarga na coluna

Com o intuito de avaliar o comportamento da separação dos enantiômeros do rolipram em condições de alta concentração, foram realizados experimentos variando-se a concentração total de alimentação da mistura (0,50; 1,00; 2,50; 5,00 e 10,00 mg/mL) a um

volume de injeção constante e igual a 20 μL . As respostas foram monitoradas pelo sistema UV-VIS no comprimento de onda de 270 nm.

Determinação das isotermas de adsorção lineares pelo método da análise frontal

A obtenção das isotermas competitivas de adsorção dos enantiômeros do rolipram na região linear, baseou-se na determinação da curva de ruptura para a mistura racêmica nas concentrações 0,50; 1,00; 2,00 e 3,00 mg/mL. A princípio, a coluna foi equilibrada com a fase móvel sendo alimentada por uma das bombas do sistema de CLAE, sob vazão de 2,00 mL/min. O estado de equilíbrio foi observado quando a resposta do sistema de detecção se manteve invariável. Neste momento programou-se uma repentina troca na alimentação do sistema, de forma que, a segunda bomba substituiu a alimentação da fase móvel pela solução de rolipram. Um volume contínuo foi alimentado até a saturação da coluna (14 mL), situação na qual a concentração na saída foi a mesma da alimentação. Houve então mudança para a bomba inicial de alimentação de fase móvel e assim se manteve o experimento até a completa remoção do rolipram da coluna. Este procedimento foi seguido para as diferentes concentrações e a análise da resposta do sistema de detecção possibilitou o cálculo dos pontos da isoterma competitiva. Para as concentrações 0,50; 1,00 e 2,00 mg/mL o detector foi mantido em 254 nm. No entanto, concentrações maiores extrapolaram o limite de detecção do sistema. O experimento na concentração 3,00 mg/mL foi realizado em 300 nm, pois neste comprimento de onda a absorbância dos enantiômeros é menor, possibilitando realizar o experimento sem o estouro da escala. Curvas analíticas nos dois comprimentos de onda possibilitaram a determinação das concentrações a partir da resposta do detector.

Separação dos enantiômeros em batelada

A separação dos enantiômeros em batelada constou com a alimentação, em uma única coluna, de uma solução com concentração 8,0 g/L por um período de 5 minutos a uma vazão de 1,00 mL/min, totalizando uma massa injetada de 40 mg. A coleta dos enantiômeros separados foi realizada imediatamente após a passagem pelo sistema de

análise. Esta coleta foi possível uma vez que poder-se-ia acompanhar a eluição dos componentes por meio da resposta do detector (270 nm) apresentada na tela do monitor. O início de cada coleta foi considerado como sendo o início da detecção de cada componente e se arrastou até o final de sua detecção. A pureza dos enantiômeros em cada fração coletada foi determinada injetando-se 20 µL de cada amostra no sistema cromatográfico e analisando-se a área sob o perfil de eluição em cada situação, de acordo com a Equação 3.9.

$$P_i = \left(\frac{Área_i}{Área_1 + Área_2} \right) \cdot 100, \quad i = 1,2 \quad (3.9)$$

Capítulo 4

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

No presente capítulo serão apresentados os resultados alcançados a partir dos experimentos realizados em laboratório. Estes resultados serão discutidos baseados na literatura, a fim de verificar a consistência com a mesma. Será apresentado um estudo sobre os fenômenos que interferem no processo de eluição dos enantiômeros no leito empacotado. Neste contexto, determinaram-se os parâmetros analíticos de separação, os efeitos de transferência de massa e termodinâmicos, bem como o comportamento dos enantiômeros na situação de equilíbrio por meio das isotermas de adsorção. Ao final, oito colunas cromatográficas foram caracterizadas e os resultados farão parte de uma simulação computacional do processo de separação contínuo em LMS, tendo como resultado os perfis de concentração nas correntes de saída do sistema.

4.1. DEFINIÇÃO E OTIMIZAÇÃO DA FASE MÓVEL

Sendo já definido, na presente dissertação, o complexo polimérico *O,O'*-bis[4-*terc*-butilbenzoil]-*N,N'*-dialil-*L*-tartardiamida como fase estacionária, realizou-se um estudo para definir e otimizar a fase móvel.

Os primeiros experimentos foram realizados com a mistura de hexano e etanol, em diferentes proporções, sem proporcionar separação dos enantiômeros. Outras combinações de solventes foram testadas e a que apresentou indício de separação foi a que conteve MTBE. De fato, segundo Andersson et al. (1996), em geral, alterando-se o componente

polar da fase móvel de um álcool para um éter, há como resultado maiores valores de fator de retenção e fator de separação, devido a menor competição com a fase móvel pelos sítios de adsorção. A Figura 4.1 mostra um ensaio cromatográfico, na qual a fase móvel foi composta exclusivamente por MTBE. Nota-se que, apesar de ocorrer separação, não se tratou de uma situação ótima. A definição dos picos não foi adequada e há uma assimetria visualmente acentuada. A Figura 4.2 expõe um cromatograma, na qual a corrida cromatográfica foi realizada com fase móvel contendo MTBE e 30% (v/v) de EtOAc, mantendo-se as mesmas condições de vazão e comprimento de onda. Esta proporção dos solventes apresentou a melhor separação. A adição de acetato de etila proporcionou separação total dos enantiômeros com picos bem definidos.

Apesar de alcançar uma condição de fase móvel satisfatória para os experimentos de separação dos enantiômeros, o objetivo de otimizá-la inclui a questão do tempo necessário para a separação. Uma vez que a fase estacionária apresenta características polares, de acordo com Löwendahl e Allenmark (1997), um aumento da polaridade da fase móvel leva à diminuição do tempo de retenção dos enantiômeros, pelo mesmo fato já mencionado de competição pelos sítios de adsorção. Com a intenção de reduzir a variável tempo, foram realizados experimentos com a adição de álcoois à fase móvel, como 2-propanol e etanol, ambos com características polares.

A Figura 4.3 mostra uma redução no tempo de corrida, após a adição de 10% de 2-propanol à fase móvel contendo MTBE e EtOAc. Observa-se que a separação não ocorreu por linha de base. Outras proporções deste álcool foram analisadas, sem alcançar melhores resultados. Na corrida cromatográfica apresentada na Figura 4.4, o álcool utilizado foi o etanol. A fase móvel apresentou composição MTBE/EtOAc/etanol (60/35/5, v/v). Várias combinações com este álcool foram testadas, mas esta condição forneceu os melhores resultados de separação. Visualmente não foi observado efeito de cauda e o perfil de eluição mostra separação por linha de base. O enantiômero menos retido apresentou tempo de retenção de 9,205 min, enquanto o mais retido 10,650 min. De acordo com este resultado, esta combinação de solventes foi utilizada como fase móvel para todas as etapas do trabalho e, para evitar menção excessiva, será omitida sua indicação.

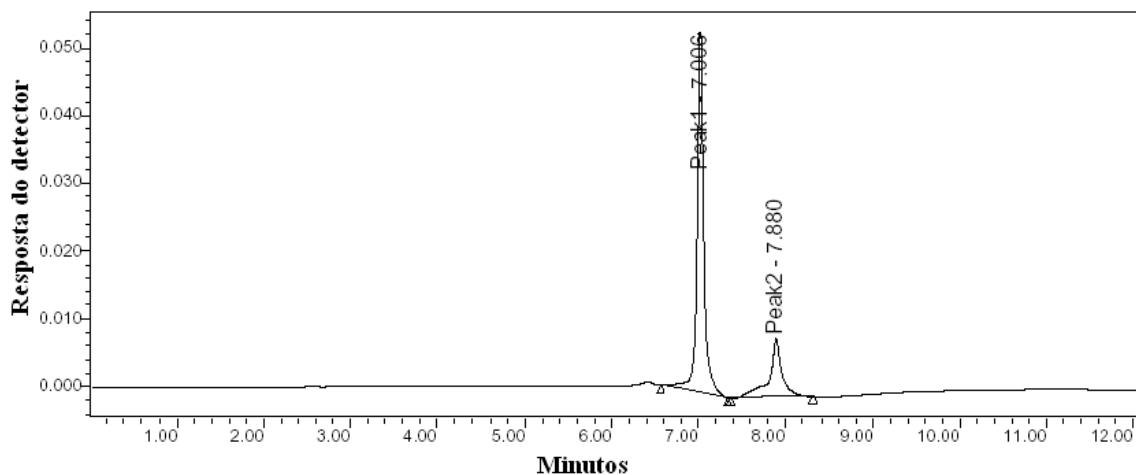


Figura 4.1. Cromatograma da separação dos enantiômeros do rolipram. Fase Móvel: MTBE, $Q = 2,00$ mL/min e $\lambda = 270$ nm.

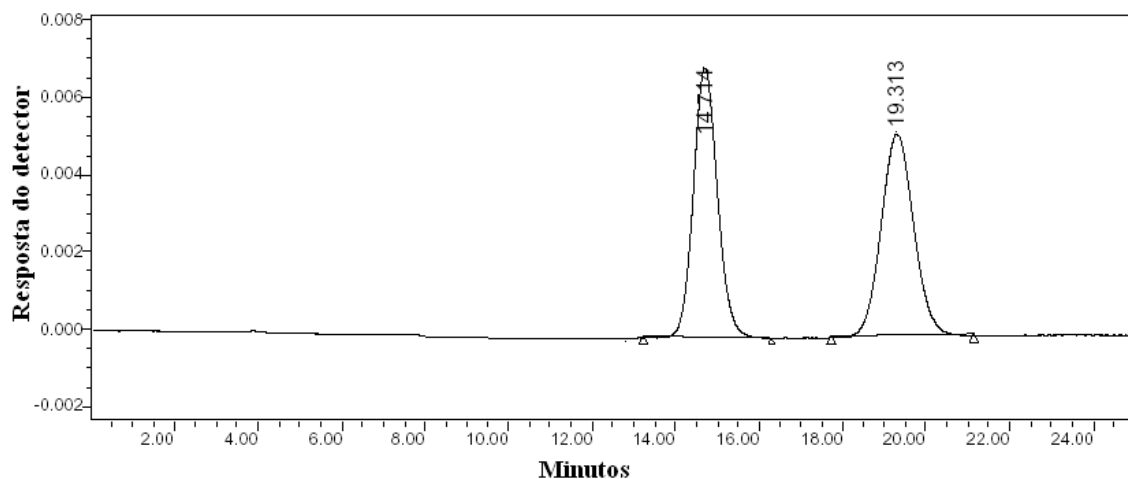


Figura 4.2. Cromatograma da separação dos enantiômeros do rolipram. Fase Móvel: MTBE/EtOAc (70/30, v/v), $Q = 2,00$ mL/min e $\lambda = 270$ nm.

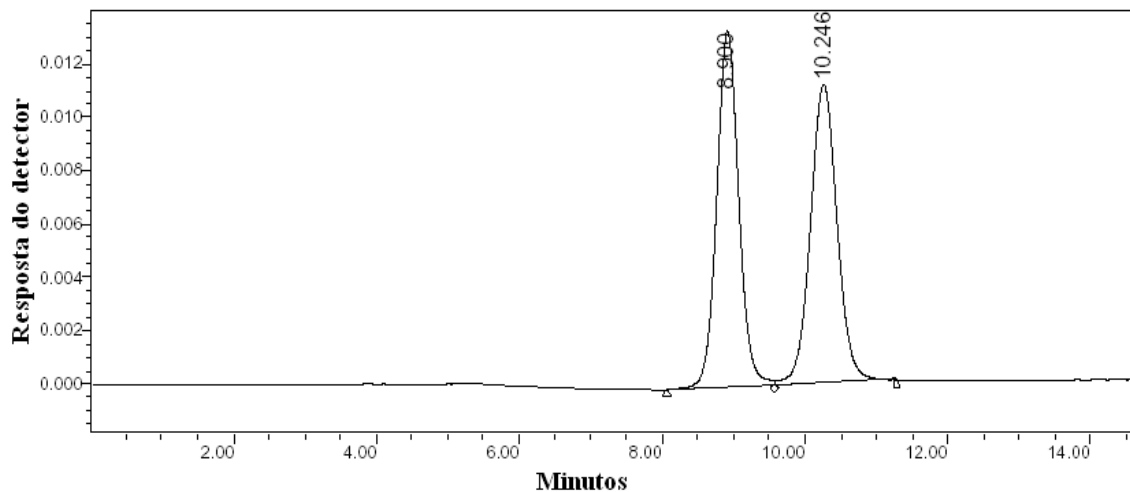


Figura 4.3. Cromatograma da separação dos enantiômeros do rolipram. Fase Móvel: MTBE/EtOAc/2-propanol (60/30/10, v/v), $Q = 2,00$ mL/min e $\lambda = 270$ nm.

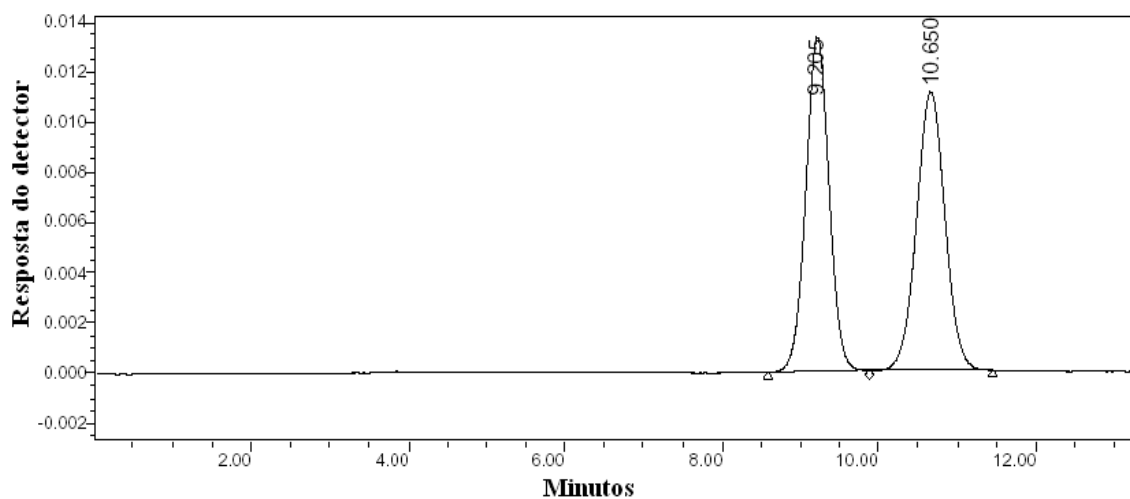


Figura 4.4. Cromatograma da separação dos enantiômeros do rolipram. Fase Móvel: MTBE/EtOAc/etanol (60/35/5, v/v), $Q = 2,00$ mL/min e $\lambda = 270$ nm.

Collins, Braga e Bonato (2006) relataram que a força cromatográfica da fase móvel é determinada pela polaridade dos solventes que a compõe. Os parâmetros de polaridade (ϵ^0) para os solventes definidos como apropriados segundo Snyder para cromatografia de adsorção podem ser vistos na Tabela 4.1, juntamente com outras propriedades físicas.

Tabela 4.1. Propriedades dos solventes utilizados na fase móvel.

Solventes	ϵ^0	μ (mPa.s), 25°C	ρ (g/cm ³)	PE (°C)	λ (nm)
EtOAc	0,58	0,44	0,90	77	250
EtOH	0,88	1,08	0,79	78	210
MTBE	0,35	0,77	0,74	55	210
2-propanol	0,82	2,30	0,78	82	210

ϵ^0 : parâmetro de polaridade segundo Snyder para cromatografia por adsorção

μ : viscosidade dinâmica

ρ : massa específica

PE: ponto de ebulição

λ : comprimento de onda limite para uso com detector por absorbância no ultravioleta

Fonte: (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006)

4.2. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DO SISTEMA DE DETECÇÃO

Realizou-se uma varredura em espectrofotômetro UV-VIS com a mistura enantiomérica de rolipram em concentração total de 0,15 mg/mL. A Figura 4.5 mostra a variação da absorbância com o comprimento de onda. Nota-se que há resultado de absorbância para a mistura na faixa de 254 a 300 nm, com resposta máxima em torno de 280 nm. Serão utilizados nos experimentos comprimentos de onda na faixa de 270 a 290 nm, salvo quando mencionado outro valor.

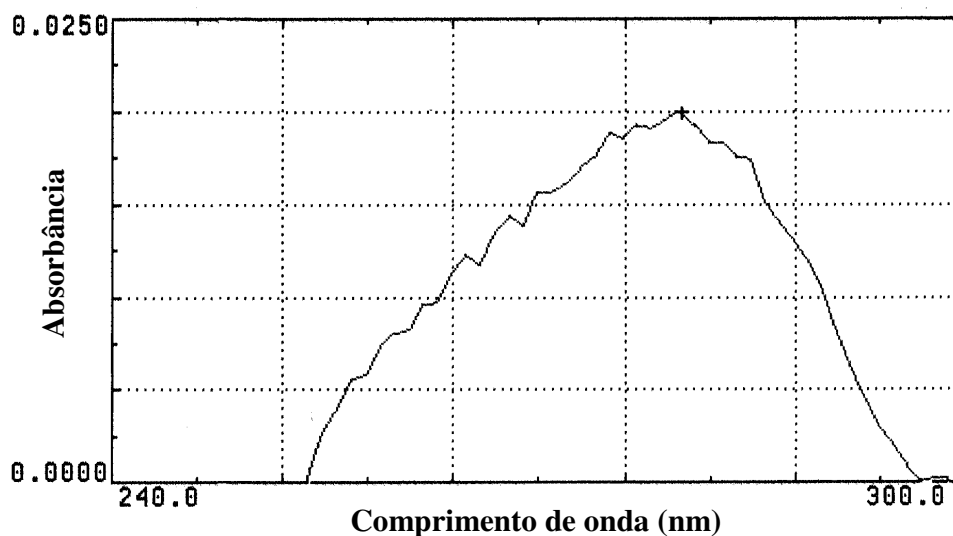


Figura 4.5. Varredura em espectrofotômetro UV-VIS para a mistura enantiomérica do rolipram em concentração 0,15 mg/mL.

4.3. ORDEM DE ELUIÇÃO

A definição da ordem de eluição dos enantiômeros fundamentou-se em dizer qual a seqüência de saída dos mesmos pela coluna cromatográfica. Para tanto, utilizou-se um sistema de detecção baseado em dicroísmo circular (DC) e UV-VIS. Na aplicação do dicroísmo circular para a análise de misturas enantioméricas, os sinais obtidos são proporcionais à diferença de concentração entre os dois enantiômeros (BLANCO et al., 2001). Na ocasião da separação, cada enantiômero dará uma resposta característica, sendo esta positiva ou negativa.

A Figura 4.6 mostra o perfil de eluição dos enantiômeros, em que, a linha azul se refere à resposta do detector UV-VIS e a linha vermelha à resposta do DC. Nota-se que o enantiômero menos retido sai em aproximadamente 22 minutos e proporciona rotação positiva do plano da luz. Desta forma, percebe-se que o primeiro componente a sair pela coluna, nas condições experimentais descritas, trata-se do (*S*)-(+)-rolipram. Por conseqüência, o mais retido, que sai próximo aos 24 minutos, apresenta rotação negativa para o plano da luz e se refere ao (*R*)-(-)-rolipram. A nomenclatura (*S*)-(+) e (*R*)-(-) para os enantiômeros estão de acordo com o fornecedor.

É importante ressaltar que para proceder este estudo foi realizado uma adaptação no sistema LMS, de forma a desviar a passagem de fluido apenas por uma de suas colunas, estando esta conectada ao sistema de análise. Por esta razão o volume morto resultante é bem maior que o apresentado pelo sistema cromatográfico utilizado nos demais experimentos. Isto explica os maiores tempos de retenção para os componentes.

Nota-se um pico registrado próximo aos 17 minutos. Este se trata possivelmente de impureza presente na amostra.

Por se tratar de um experimento meramente com finalidades qualitativas, não houve prévio ajuste do sistema de análise, por isso os sinais apresentados por ambos os detectores apresentaram-se negativos na maior parte do tempo.

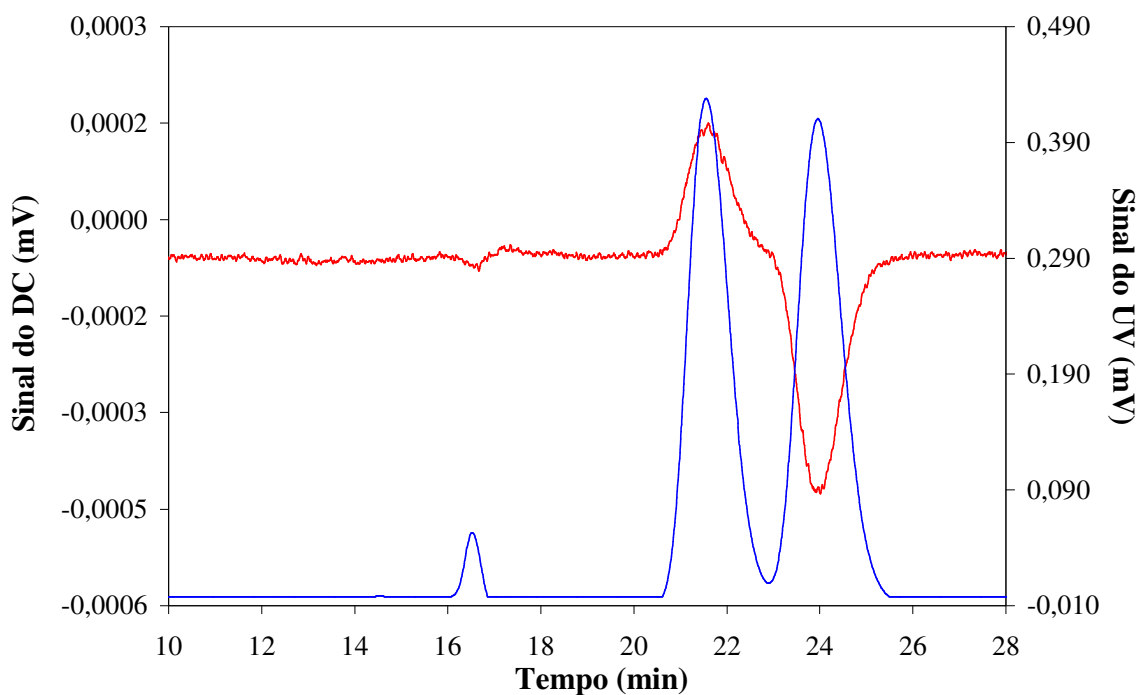


Figura 4.6. Ordem de eluição dos enantiômeros do rolipram. (—) sinal do UV-VIS, (—) sinal do DC. $c_{\text{amostra}} = 0,15 \text{ mg/mL}$, $V_{\text{inj}} = 200 \text{ }\mu\text{L}$, $Q = 2,00 \text{ mL/min}$ e $\lambda = 270 \text{ nm}$.

4.4. EXPERIMENTOS COM SOLUÇÕES DILUÍDAS

4.4.1. Parâmetros analíticos de separação

As Figuras 4.7 e 4.8 apresentam os perfis de eluição do composto inerte TTBB e dos enantiômeros do rolipram, respectivamente. Estes experimentos foram realizados em duplicata com vazão de fase móvel de 2,00 mL/min. Nota-se na Figura 4.7 que o tempo de retenção e a largura da base do pico de eluição são relativamente pequenos. Este resultado é esperado, visto que se trata de um composto que não sofre interações estereosseletivas com a fase estacionária quirál (FEQ). Na Figura 4.8, apesar das larguras das bases dos picos de eluição dos enantiômeros do rolipram serem pequenas, são maiores que a do TTBB, demonstrando as diferenças no processo de eluição entre o composto inerte e os que sofrem interações com a fase estacionária. Com o intuito de averiguar como estas interações se comportam em condições experimentais adversas, foram analisados os parâmetros analíticos de separação em diferentes vazões de fase móvel e temperaturas.

A Tabela 4.2 apresenta os parâmetros analíticos de separação de cada composto em diferentes vazões a 25°C. Os fatores de retenção (k) apresentaram valores médios de 0,654 e 0,940 para os enantiômeros *S*-(+) e *R*-(-), respectivamente. Os fatores de assimetria (A_s) apresentaram-se de 3 a 4% distantes da unidade, mostrando comportamento próximo ao Gaussiano. O fator de separação (α) mostrou-se em um valor próximo a 1,44. De acordo com Francotte e Jucker-Buchheit (1992), um dos fatores que determinam a seletividade a um enantiômero frente ao outro é a capacidade de reconhecimento da FEQ. O ponto mais importante para assegurar sucesso na separação de uma mistura enantiomérica é trabalhar em condições de alto fator de separação. Okamoto e Kaida (1994), reportaram que completa separação de enantiômeros em colunas quirais, baseadas em polissacarídeos, ocorrem em um valor mínimo de 1,20. No presente estudo, apesar da fase estacionária não ser baseada em polissacarídeo, alcançaram-se resultados superiores ao comentado por estes autores.

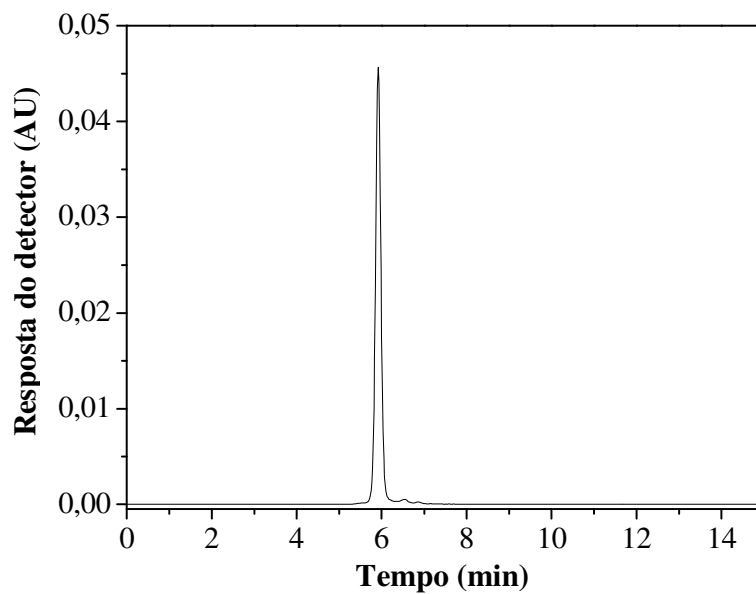


Figura 4.7. Perfil de eluição do composto inerte TTBB. $c_{\text{TTBB}} = 1,50$ mg/mL, $Q = 2,00$ mL/min e $\lambda = 270$ nm.

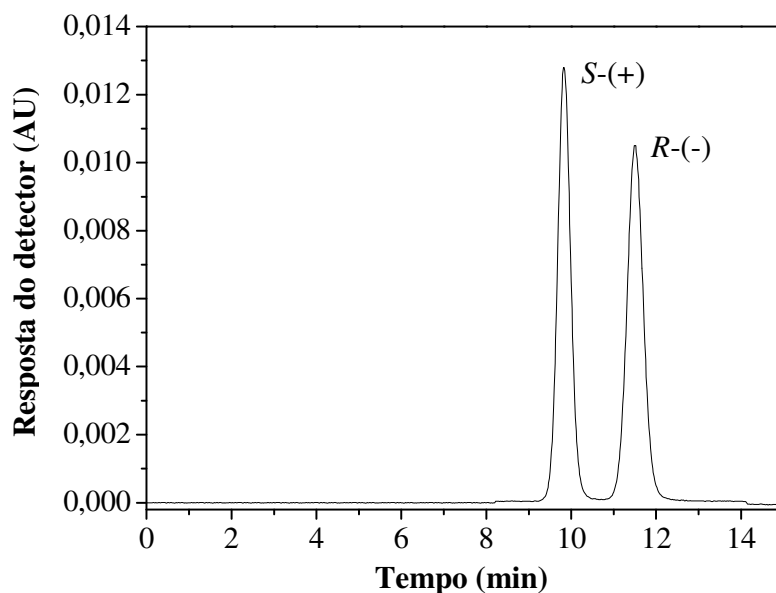


Figura 4.8. Perfil de eluição dos enantiômeros. $c_{\text{mistura}} = 0,15$ mg/mL, $Q = 2,00$ mL/min e $\lambda = 270$ nm.

Tabela 4.2. Parâmetros analíticos de separação dos enantiômeros do rolipram em diferentes vazões de fase móvel a 25 °C.

Q (mL/min)	k_S	k_R	As_S	As_R	α
1,00	0,661	0,953	1,042	1,033	1,441
2,00	0,658	0,941	1,047	1,045	1,430
3,00	0,650	0,937	1,034	1,033	1,442
4,00	0,645	0,930	1,033	1,028	1,442

Apesar de tudo, o fator de separação não inclui informações sobre a largura dos picos, e não é adequada para descrever a separação de enantiômeros por si só. Neste caso, outra variável importante a ser determinada é a resolução (R_S), que, em sua forma geral, engloba parâmetros de eficiência, retenção e separação. A resolução foi avaliada nas diferentes vazões e temperaturas como pode ser visto na Figura 4.9. Para as condições analisadas houve diminuição da resolução provocada tanto pelo aumento da vazão quanto pelo aumento da temperatura. Isto ocorreu porque as moléculas dos enantiômeros têm menos tempo para interagir com a fase estacionária. Dentro das condições experimentais estudadas, valor ótimo de resolução foi obtido em 1,00 mL/min e 25°C.

A Figura 4.10 ilustra como o aumento da temperatura pode diminuir os tempos de retenção dos enantiômeros nas diferentes vazões. Este fato, juntamente com a diminuição da largura da base dos picos, influenciaram diretamente na diminuição da resolução apresentada.

A Tabela 4.3 expõe a influência da temperatura sobre os parâmetros analíticos de separação, mantendo-se a vazão de fase móvel constante em 2,00 mL/min. O sistema de análise foi ajustado em $\lambda = 270$ nm e a concentração da mistura enantiomérica injetada foi de 0,15 mg/mL.

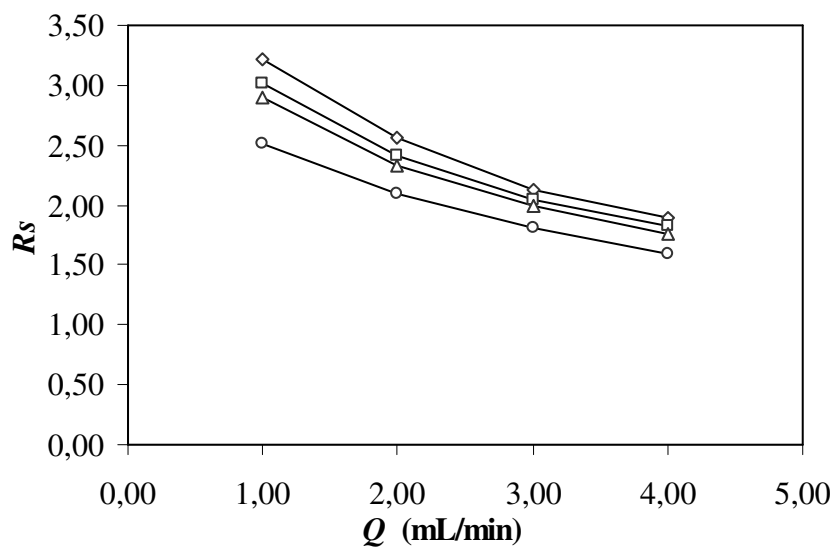


Figura 4.9. Variação da resolução na separação dos enantiômeros com a vazão, para as temperaturas: (\diamond) 25°C; (\square) 30°C; (Δ) 35°C e (\circ) 45°C. $c_{\text{mistura}} = 0,15 \text{ mg/mL}$, $V_{\text{inj}} = 20 \text{ }\mu\text{L}$ e $\lambda = 270 \text{ nm}$.

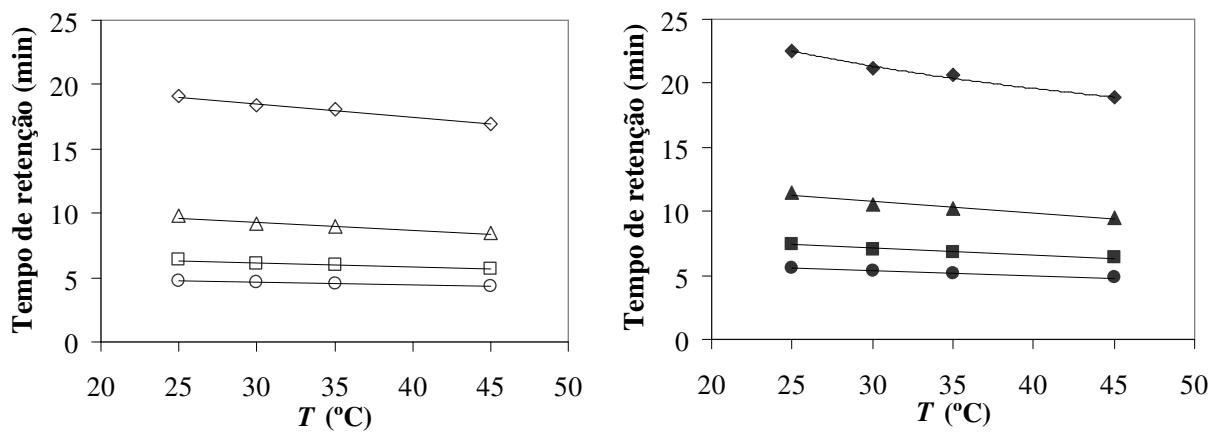


Figura 4.10. Variação do tempo de retenção com a temperatura, para as vazões: (\diamond e \blacklozenge) 1,00; (Δ e \blacktriangle) 2,00; (\square e \blacksquare) 3,00 e (\circ e \bullet) 4,00 mL/min. Símbolos vazados para o composto menos retido e símbolos preenchidos para o mais retido. $c_{\text{mistura}} = 0,15 \text{ mg/mL}$ e $\lambda = 270 \text{ nm}$.

Tabela 4.3. Efeito da temperatura nos parâmetros analíticos de separação para $Q = 2,00$ mL/min, $c_{\text{mistura}} = 0,15$ mg/mL e $\lambda = 270$ nm.

T (°C)	k_S	k_R	As_S	As_R	α
25	0,661	0,943	1,05	1,04	1,427
30	0,616	0,863	1,04	1,04	1,401
35	0,585	0,805	1,03	1,03	1,376
45	0,532	0,707	1,00	1,01	1,329

Os experimentos realizados na temperatura de 25°C proporcionaram, para os dois enantiômeros, maiores valores de k , que diminuíram com a elevação da temperatura. Comportamento semelhante pôde ser notado para As e α . No caso de As , os picos ficaram mais simétricos na temperatura mais alta. A Figura 4.11 mostra a aproximação dos picos de eluição dos enantiômeros e, isto explica a diminuição de α com o aumento da temperatura. Como relatado por Berthod, He e Beesley (2004), o fator de separação para enantiômeros pode ser afetado por mudanças na temperatura, especialmente em situações dominadas pela termodinâmica.

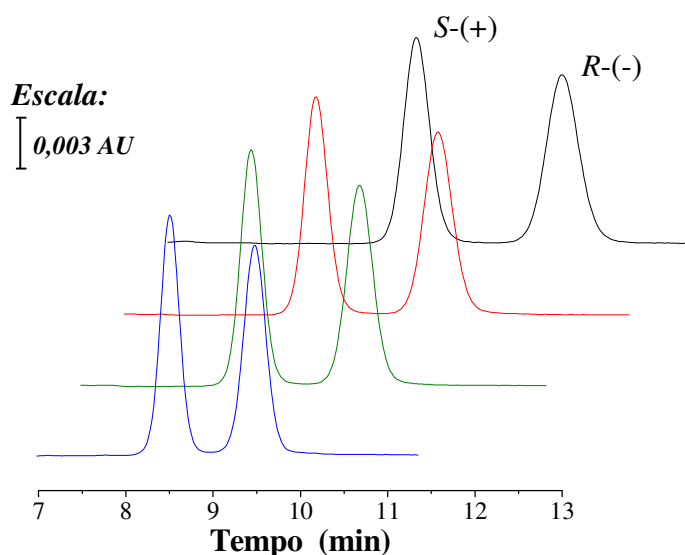


Figura 4.11. Perfis de eluição da mistura enantiomérica. (—) 45°C, (—) 35°C, (—) 30°C, (—) 25°C. $Q = 2,00$ mL/min, $c_{\text{mistura}} = 0,15$ mg/mL e $\lambda = 270$ nm.

4.4.2. *Determinação das porosidades do sistema e constantes de Henry*

Antes de se determinar os valores de porosidade, precisa-se conhecer o tempo referente ao volume morto (t_{VM}) do sistema cromatográfico. Trata-se do tempo que a amostra leva para percorrer o volume existente desde o injetor até o detector, passando pelos tubos e conexões sem a presença da coluna. Para isso, foram realizadas injeções cromatográficas de 20 μL de solução contendo o composto inerte TTBB em concentração de 1,50 mg/mL. Encontrou t_{VM} igual a 0,037 min para vazão de 2,00 mL/min. Por meio da Equação 4.1 tem-se o volume morto (V_M) do sistema igual a 0,074 mL.

$$V_M = t_{VM} \cdot Q \quad (4.1)$$

A porosidade total da coluna (ε_T) foi determinada pela Equação 3.1, de acordo com a metodologia proposta. O valor alcançado para temperatura de 25°C e vazão 2,00 mL/min foi 0,599. No entanto, houve variação para outras temperaturas. Os valores médios de ε_T para as vazões de 1,00; 2,00; 3,00 e 4,00 mL/min em diferentes temperaturas são apresentados na Tabela 4.4. Verificou-se que ε_T foi independente da vazão e apresentou pequena variação com a temperatura, chegando próximo a 4% de redução em seus valores com a elevação de 20°C.

Tabela 4.4. Valores de porosidade total em diferentes vazões e temperaturas.

Q (mL/min)	Temperatura (°C)			
	25	30	35	45
1,00	0,583	0,573	0,575	0,560
2,00	0,599	0,575	0,571	0,561
3,00	0,583	0,576	0,573	0,564
4,00	0,585	0,576	0,574	0,568
<i>Média</i>	0,588	0,575	0,573	0,563

Os valores de ε_T , juntamente com os tempos de retenção dos enantiômeros, foram utilizados para o cálculo de He , de acordo com a Equação 3.3, para diferentes vazões de fase móvel e temperaturas.

Os resultados expostos na Figura 4.12 mostram pequena influência de He perante a vazão, sendo, no entanto, bastante influenciado pela temperatura. Isto já era esperado, uma vez que se trata de um parâmetro relacionado a efeitos termodinâmicos. O aumento da temperatura faz diminuir as interações dos solutos com a fase estacionária e ainda a viscosidade da fase móvel, levando a uma diminuição dos seus tempos de retenção e conseqüente diminuição de He (Equação 3.3). Há leve diminuição neste parâmetro, para os dois enantiômeros, com o aumento da vazão nas temperaturas mais baixas, possivelmente por algum efeito de transferência de massa pouco pronunciado.

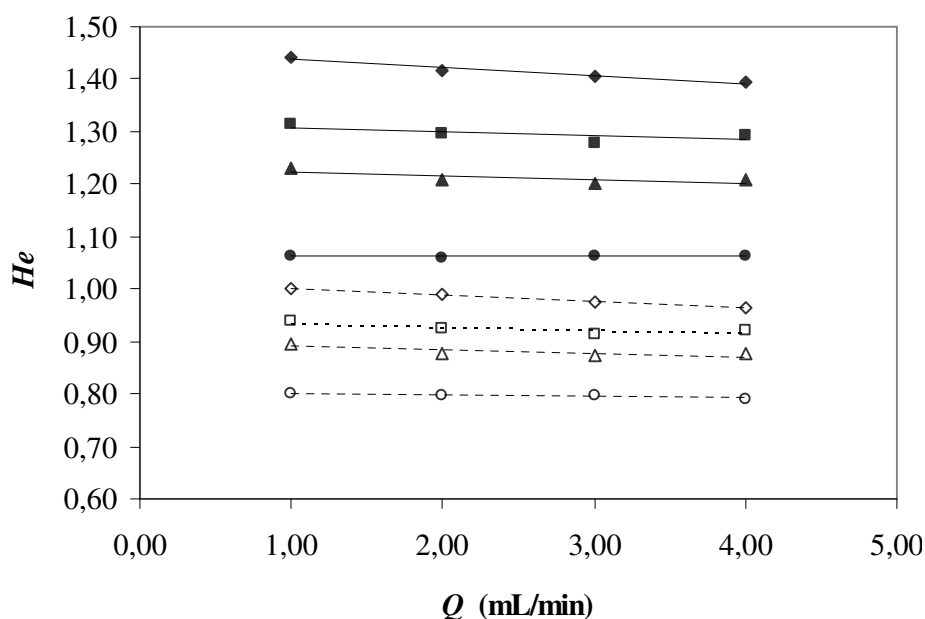


Figura 4.12. Variação das constantes de Henry para as temperaturas: (◇ e ◆) 25°C; (□ e ■) 30°C; (△ e ▲) 35°C e (○ e ●) 45°C. Os símbolos preenchidos se referem ao R-(-)-rolipram e os vazados ao S-(+)-rolipram.

De acordo com Mazzotti, Storti e Mobidelli (1997b) as constantes de Henry são parâmetros fundamentais para o projeto das condições operacionais do sistema LMS, por isso torna-se importante a escolha de uma temperatura de trabalho adequada.

A determinação da porosidade do leito (ε) foi realizada de acordo com o método dos momentos para isotermas lineares a 25°C. A Figura 4.13 apresenta o primeiro momento para o composto inerte poliestireno. Com coeficiente de correlação de 0,9999, obteve-se ε igual a 0,384.

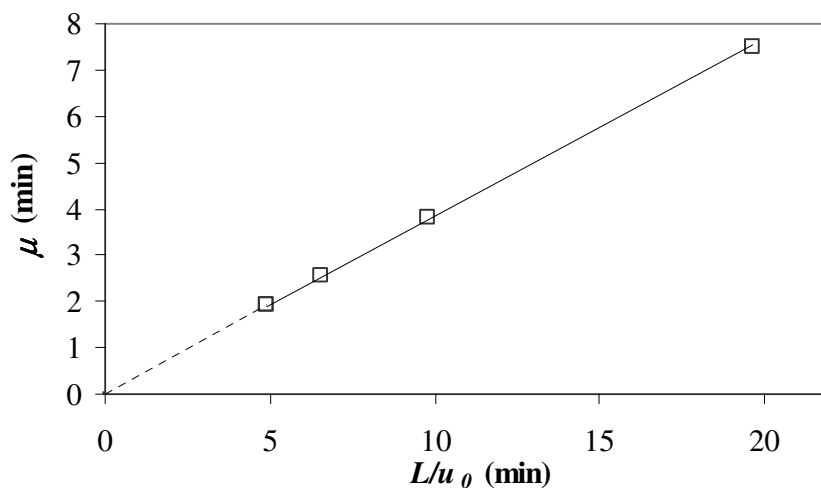


Figura 4.13. Primeiro momento para o composto inerte poliestireno a 25°C.

Tendo-se as porosidades total e do leito, pôde-se determinar o valor da porosidade das partículas (ε_p) seguindo as definições de porosidades (Equação 3.2). Obteve-se ε_p igual a 0,351. Este valor corresponde à fração de vazio das partículas que compõem a fase estacionária que recheia a coluna cromatográfica.

4.4.3. *Determinação das constantes de equilíbrio de adsorção*

Por meio da inclinação das retas apresentadas na Figura 4.14, que relacionam μ e L/u_0 em diferentes temperaturas, foi possível determinar, usando-se a Equação 2.4, as constantes de equilíbrio de adsorção (K_P) para os enantiômeros do rolipram. Estas correspondem às constantes de Henry (He), uma vez que estão relacionadas a soluções diluídas.

A Tabela 4.5 apresenta os resultados para K_P nas temperaturas estudadas (25, 30, 35 e 45°C). Nota-se que os coeficientes de correlação se mostraram muito próximos à

unidade, indicando que os pontos experimentais foram bem ajustados a uma reta. Como esperado, o enantiômero *R*-(-) obteve maiores valores de K_P , comprovando sua maior interação com o material adsorvente. Estes valores diminuíram com o aumento da temperatura.

A temperatura influencia diretamente nas propriedades físicas tanto do material adsorvente quanto dos solventes que compõem a fase móvel. Como a retenção de um componente é governada por um complexo triângulo de interações entre o soluto, o adsorvente e a fase fluida, a elevação da temperatura acaba refletindo na intensidade de interação dos enantiômeros, e por consequência, nos valores de K_P (SUBRA; VEGA-BANCEL; REVERCHON, 1998).

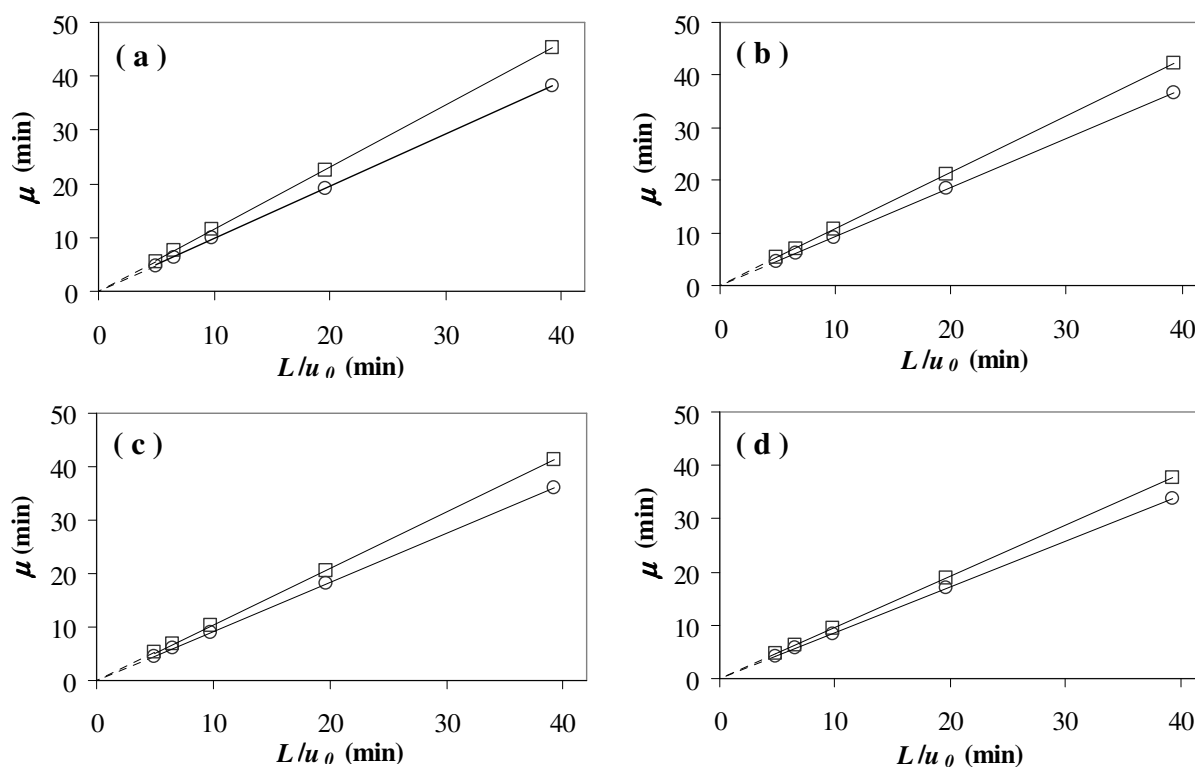


Figura 4.14. Análise do primeiro momento para determinação das constantes de equilíbrio de adsorção para os enantiômeros (\square) *R*-(-) e (\circ) *S*-(+), nas temperaturas: (a) 25°C, (b) 30°C, (c) 35°C e (d) 45°C.

Tabela 4.5. Valores das constantes de equilíbrio de adsorção para os enantiômeros do rolipram em diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Constantes de equilíbrio de adsorção (K_P)			
	R-(-)	r^2	S-(+)	r^2
25	1,377	0,99996	0,938	0,99990
30	1,193	0,99999	0,833	0,99999
35	1,127	0,99998	0,804	0,99999
45	0,889	0,99998	0,647	0,99999

4.4.4. *Eficiência de separação e coeficientes de transferência de massa*

A eficiência da separação da coluna cromatográfica pôde ser avaliada a partir da análise de H , que é determinada a partir do número de pratos (N_P), por meio da Equação 2.8. A Tabela 4.6 expõe os valores de N_P nas faixas de vazão e temperatura estudadas. Os altos valores de N_P alcançados revelam alta eficiência de separação da coluna, destacando os valores superiores a 9000 para a vazão de 1,00 mL/min e temperatura de 45°C. Observa-se que, a uma mesma vazão, os valores aumentaram com o aumento da temperatura, isso porque houve uma diminuição mais acentuada na largura da base do pico do que no tempo de retenção dos enantiômeros (Equação 2.9). Por outro, a uma temperatura constante, os valores diminuíram com o aumento da vazão. Iso ocorre uma vez que há forte diminuição do tempo de retenção dos enantiômeros. Estes comportamentos estão de acordo com a literatura. Segundo (SNYDER; KIRKLAND, 1979), geralmente, baixos valores de H (conseqüentemente altos valores de N_P) são alcançados em colunas empacotadas com partículas relativamente pequenas sob baixa vazão de fase móvel e altas temperaturas de separação.

A partir dos valores apresentados na Tabela 4.6, a Equação 2.8 foi utilizada para o cálculo dos valores de H . As Figuras 4.15 e 4.16 mostram a dependência da H com a velocidade superficial de escoamento da fase móvel (u_0) (gráfico de van Deemter) para os

enantiômeros *R*-(-) e *S*-(+), respectivamente. Para a faixa de vazão utilizada observou-se relação linear entre H e u_0 e não foi verificado o ponto de inflexão mínimo para nenhum dos enantiômeros tal como apresentado na Figura 2.5. Para isso seriam necessárias vazões mais baixas. Esse resultado significa que, de acordo com o gráfico de van Deemter, os efeitos de difusão molecular não influenciam no processo de eluição.

Tabela 4.6. Número de pratos em diferentes vazões e temperaturas.

Q (mL/min)	T (°C)	N_{pS}	N_{pR}	Q (mL/min)	T (°C)	N_{pS}	N_{pR}
1,00	25	6940	6050	3,00	25	3218	2726
	30	7806	7138		30	3765	3333
	35	8420	7770		35	4100	3649
	45	9395	9001		45	4796	4260
2,00	25	4660	4086	4,00	25	2552	2141
	30	5091	4583		30	2925	2551
	35	5547	5038		35	3207	2844
	45	6573	6006		45	3616	3216

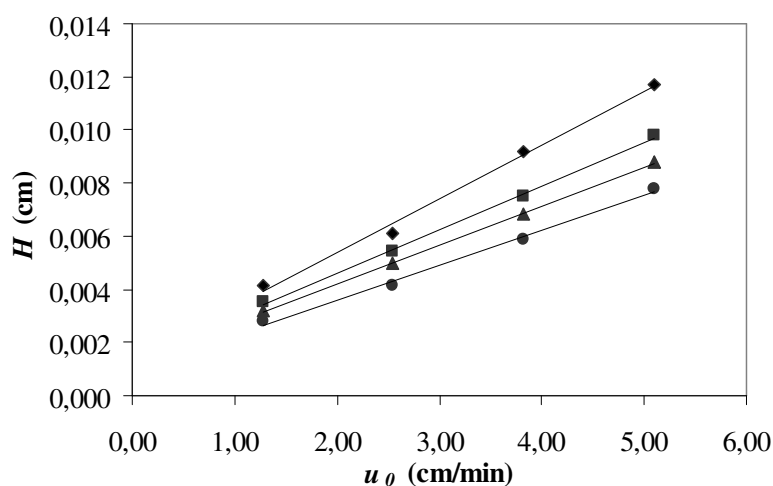


Figura 4.15. Gráfico de van Deemter para o enantiômero *R*-(-)-rolipram nas temperaturas: (♦) 25°C; (■) 30°C; (▲) 35°C e (●) 45°C.

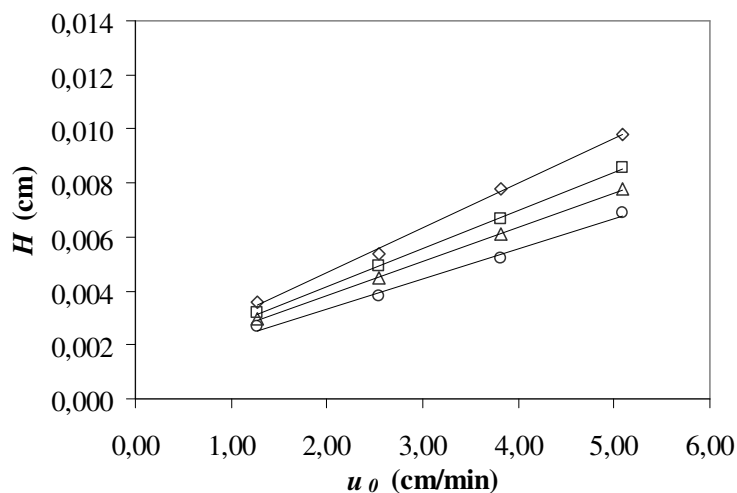


Figura 4.16. Gráfico de van Deemter para o enantiômero *S*-(+)-rolipram nas temperaturas: (◇) 25°C; (□) 30°C; (Δ) 35°C e (○) 45°C.

Os coeficientes lineares e angulares das retas apresentadas nas Figuras 4.15 e 4.16 representam os parâmetros *A* e *C* da equação de van Deemter (Equação 2.14), respectivamente. Seus valores para os dois enantiômeros em diferentes temperaturas, juntamente com os respectivos coeficientes de correlação das retas, estão indicados na Tabela 4.7.

Tabela 4.7. Parâmetros *A* e *C* da equação de van Deemter para os enantiômeros *R*-(-)-rolipram e *S*-(+)-rolipram.

<i>T</i> (°C)	<i>R</i> -(-)-rolipram			<i>S</i> -(+)-rolipram		
	<i>A</i> x 10 ³ (cm)	<i>C</i> x 10 ³ (cm)	<i>r</i> ²	<i>A</i> x 10 ³ (cm)	<i>C</i> x 10 ³ (cm)	<i>r</i> ²
25	1,352	2,025	0,99196	1,387	1,648	0,99685
30	1,331	1,644	0,99858	1,384	1,395	0,9993
35	1,303	1,462	0,99942	1,325	1,262	0,9995
45	0,972	1,311	0,99512	1,106	1,113	0,9923

A partir dos resultados apresentados na Tabela 4.7 pôde-se calcular os valores dos coeficientes de dispersão axial (D_L/u_0) e de transferência de massa global (k_m), mostrados na Tabela 4.8. Dentro da faixa de vazão de fase móvel estudada, os valores de D_L/u_0 apresentaram-se relativamente baixos, demonstrando pouca influência da dispersão axial na eluição dos enantiômeros. Comparativamente, o enantiômero *S*-(+) demonstrou maiores valores. A elevação da temperatura gerou diminuição deste efeito para ambos enantiômeros.

Tabela 4.8. Coeficientes de dispersão axial e de transferência de massa global para os enantiômeros do rolipram.

<i>T</i> (°C)	$D_L/u_0 \times 10^3$ (cm)		k_m (min ⁻¹)	
	<i>R</i> -(-)	<i>S</i> -(+)	<i>R</i> -(-)	<i>S</i> -(+)
25	0,676	0,694	220,34	289,70
30	0,666	0,692	279,08	347,21
35	0,652	0,663	317,23	385,21
45	0,486	0,553	366,70	444,22

A ordem de grandeza alcançada para k_m revela baixa resistência à transferência de massa para ambos enantiômeros em seus processos de eluição pelo leito empacotado, favorecendo a alta eficiência da coluna quirais. Duan, Ching e Swarup (1998) reportaram que colunas quirais empacotadas com partículas de sílica quimicamente modificadas apresentam alta resolução e rápida separação de compostos quirais.

A temperatura mostrou-se como um parâmetro importante na determinação dos coeficientes de transferência de massa globais, uma vez que a elevação do seu valor ocasionou aumento de cerca de 66% na ordem de grandeza de k_m para o enantiômero *R*-(-) e pouco mais de 55% para o *S*-(+).

4.4.5. Análise termodinâmica

Foram determinados os parâmetros termodinâmicos de adsorção, no processo de separação dos enantiômeros do rolipram em coluna cromatográfica contendo fase estacionária Kromasil® CHI-TBB, pelo gráfico de van't Hoff, de acordo com as Equações 2.18 e 2.19. Os coeficientes angular e linear dados pela relação linear do gráfico de $\ln k_i$ por $1/T$ permitem o cálculo, respectivamente, da entalpia e entropia de ambos enantiômeros no processo de transferência entre as fases móvel e estacionária. Esta relação, para uma vazão de 2,00 mL/min, é mostrada na Figura 4.17. Os valores obtidos para os parâmetros são relatados na Tabela 4.9. A diferença relativa na separação dos enantiômeros é observada pelo gráfico de $\ln \alpha$ por $1/T$, tal como é dado pela Figura 4.18. De acordo com a Equação 2.19, o coeficiente angular da reta se refere indiretamente a $\Delta(\Delta H^0)$ e o coeficiente linear a $\Delta(\Delta S^0)$. Apenas lembrando que o *R*-(-)-rolipram corresponde ao enantiômero mais retido.

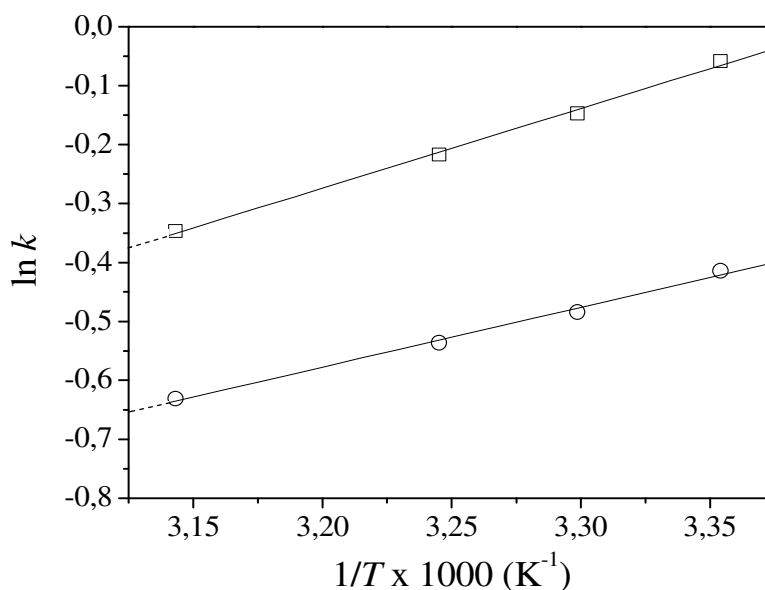
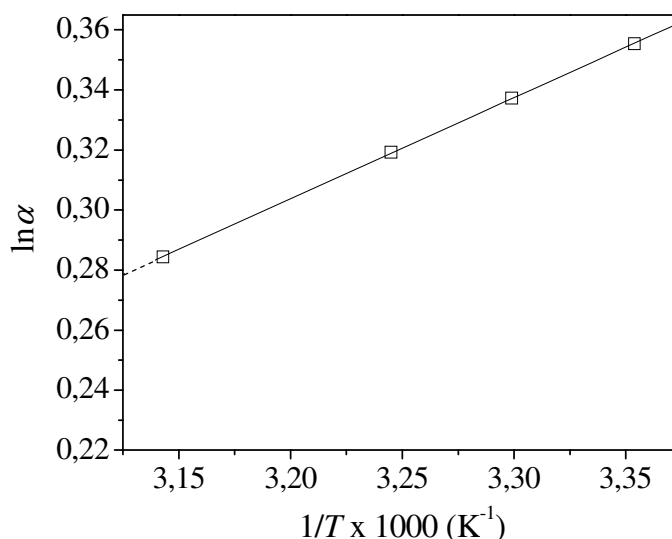


Figura 4.17. Dependência do fator de retenção dos enantiômeros do rolipram com a temperatura. (□) *R*-(-)-rolipram, (○) *S*-(+)-rolipram, $Q = 2,00$ mL/min.

Tabela 4.9. Parâmetros termodinâmicos para os enantiômeros do rolipram.

<i>rolipram</i>	ΔH° (kJ/mol)	ΔS° (J/mol.K)	r^2
<i>S</i> -(+)-rolipram	-8,43	-28,40	0,9972
<i>R</i> -(-)-rolipram	-11,23	-34,83	0,9986

**Figura 4.18.** Dependência do fator de separação dos enantiômeros do rolipram com a temperatura. $Q = 2,00$ mL/min.

Os coeficientes de correlação apresentados na Tabela 4.9 demonstram que os parâmetros termodinâmicos foram calculados a partir de retas bem ajustadas aos dados experimentais. Segundo Goossens et al. (2004), isso mostra que a fase estacionária não sofre mudanças de conformação e que as interações enantiosseletivas envolvidas durante a separação não são afetadas com o aumento da temperatura. Os valores negativos de ΔH° indicam que é favorável energeticamente ao soluto adsorver-se à fase estacionária. Os valores negativos mais acentuados para o *R*-(-)-rolipram são por conta de maior interação adsortiva, explicando assim o maior tempo de residência na coluna. De acordo com

Goossens et al. (2004), valores negativos de ΔS^0 são indicativos de um aumento na ordem do sistema cromatográfico quando o soluto é transferido da fase móvel para a fase estacionária.

Observou-se para Figura 4.18, coeficiente de correlação 0,99991, mostrando evidente dependência linear entre $\ln\alpha$ e $1/T$ na faixa de temperatura de 25 a 45°C. Os valores de $\Delta(\Delta H^0)$ e $\Delta(\Delta S^0)$ foram -2,79 kJ/mol e -6,42 J/mol.K, respectivamente. Estas grandezas representam, nesta ordem, a diferença da entalpia de adsorção e da entropia do sistema.

Goossens et al. (2004) relataram que os valores negativos de ΔH^0 , ΔS^0 , $\Delta(\Delta H^0)$ e $\Delta(\Delta S^0)$ indicam que a transferência do soluto da fase móvel para a fase estacionária e posterior separação são entalpicamente governadas.

A temperatura de isoenantiosseletividade (T_{iso}) calculada foi 161°C, isso significa que a partir desta temperatura há uma inversão na ordem de eluição dos enantiômeros. No entanto, experimentos nesta temperatura não são convenientes pois podem degradar o soluto ou danificar o recheio da coluna.

A análise dos parâmetros de transferência de massa, bem como dos parâmetros termodinâmicos revelaram que o fenômeno limitante para a separação dos enantiômeros do rolipram na fase estacionária em estudo é dado pelo equilíbrio de adsorção, uma vez que a resistência à transferência de massa é baixa.

4.5. EXPERIMENTOS COM SOLUÇÕES CONCENTRADAS

4.5.1. Variação da concentração de alimentação

A Figura 4.19 apresenta os perfis de eluição obtidos para diferentes concentrações de alimentação dos enantiômeros (0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e 10,0 mg/mL). Os experimentos foram conduzidos com a injeção de 20 μ L da amostra e vazão de fase móvel 2,00 mL/min. Pode-se notar leve diminuição nos tempos de retenção à medida que a concentração foi aumentada. Este resultado já era esperado, pois como reportado por Guiochon, Shirazi e Katti (1994), com o aumento da concentração há maior quantidade de moléculas competindo pelos sítios de adsorção disponíveis e a saturação da coluna tende a acontecer

mais rapidamente. Ou ainda, Seidel-Morgenstern e Guiochon (1993) explicam que o aumento da concentração de alimentação leva a diminuição da inclinação das isothermas de adsorção e isto conduz ao decréscimo nos tempos de retenção.

Observando a base os perfis de eluição nota-se que as separações mantiveram linha de base. No entanto, houve um leve aumento na base dos picos. Este fato pôde ser comprovado pelo aumento do fator de assimetria com o aumento da concentração, como apresentado na Figura 4.20. A linha contínua corresponde ao ajuste dos dados do enantiômero *R*-(-) e a tracejada do *S*-(+). Trata-se de um ajuste quadrático com intenção de melhor representar o comportamento crescente do fator de assimetria.

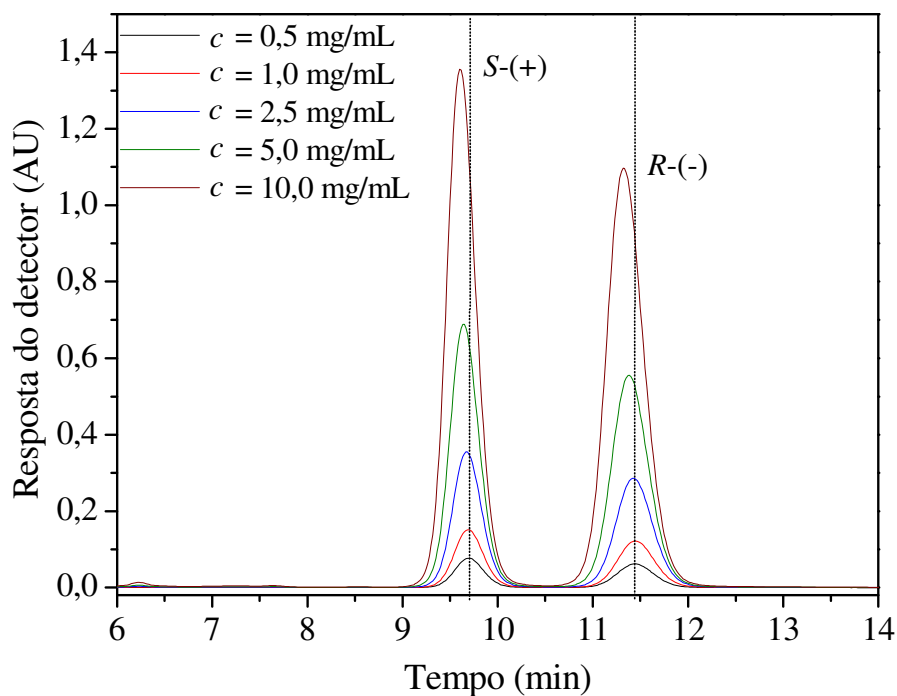


Figura 4.19. Perfis de eluição da mistura enantiomérica para diferentes concentrações de alimentação. $Q = 2$ mL/min e $\lambda = 280$ nm.

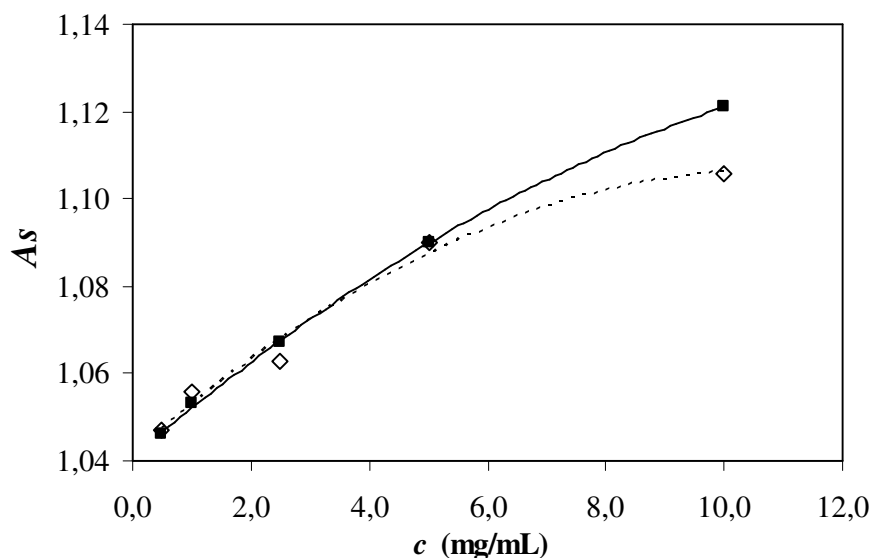


Figura 4.20. Variação do fator de assimetria com o aumento da concentração injetada. (■) *R*-(-)-rolipram, (◇) *S*-(+)-rolipram. $Q = 2,00$ mL/min e $V_{inj} = 20$ μ L.

Neste estudo, não chegou a ocorrer sobrecarga na coluna, uma vez que a quantidade mássica de soluto injetada foi pequena. Experimentos com concentrações de alimentação maiores não foram realizados por dois motivos: primeiro, concentrações acima de 10 mg/mL alcançavam o limite de solubilidade do soluto e, segundo, a quantidade de material disponível era um fator limitante. Este último motivo também justifica o fato de não se aumentar a carga de soluto simplesmente aumentando-se o volume de injeção.

Em condições de sobrecarga os perfis de eluição são controlados pela termodinâmica da adsorção e os efeitos de transferência de massa são desprezíveis (GUIOCHON; SHIRAZI; KATTI, 1994; SEIDEL-MORGENSTERN, 2004).

4.5.2. *Isotermas de adsorção*

A partir das curvas de isotermas de adsorção, pode-se obter informação a respeito do equilíbrio que se estabelece para os enantiômeros, entre as fases móvel e estacionária, durante a passagem pelo leito recheado. Os experimentos para obtenção das isotermas foram realizados utilizando-se o método da análise frontal, na temperatura de 25°C e vazão de 2,00 mL/min, de acordo com a metodologia apresentada.

A frente de adsorção, na eluição dos enantiômeros pela coluna cromatográfica, pode ser observada pela linha preta da Figura 4.21. Na mesma figura está apresentada a curva da derivada do perfil de eluição, representada pela linha vermelha. Percebe-se que há um ponto de mínimo (linha azul tracejada) da curva da derivada. Considerou-se que até este ponto, apenas o enantiômero menos retido era captado pelo sistema de análise. Este fato pode ser comprovado pela Figura 4.22, que apresenta resultados de coletas realizadas minuto a minuto, durante a eluição dos enantiômeros. Cada par de pontos, em um dado tempo, refere-se a uma coleta realizada durante o experimento. Os pontos estão apresentados no tempo médio do intervalo de coleta. Nesta figura, a linha vermelha corresponde ao enantiômero menos retido e a preta ao mais retido. Até 13 minutos detectou-se apenas o menos retido. A concentração do enantiômero neste momento foi calculada por uma curva analítica previamente construída, nas mesmas condições do experimento, levando-se em conta a área sob o pico de eluição.

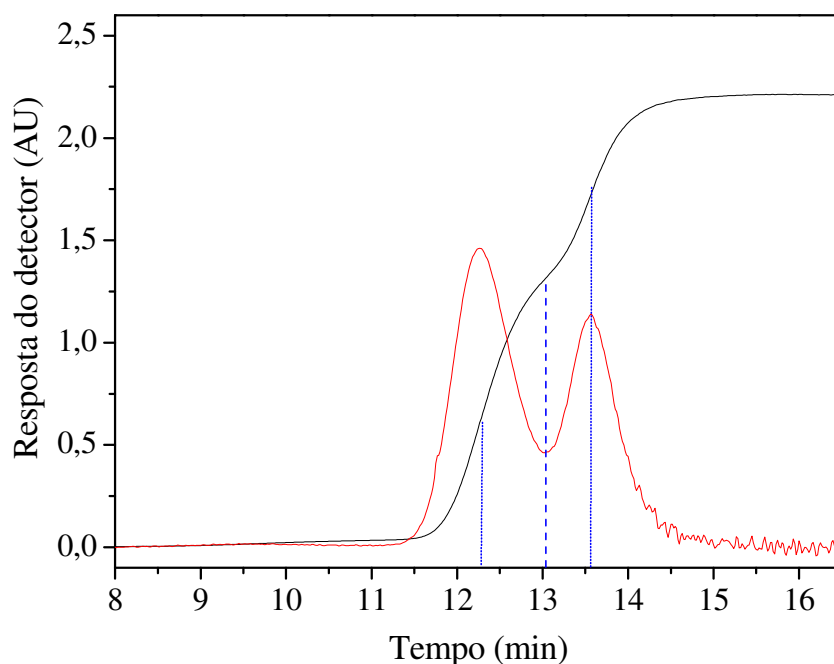


Figura 4.21. Curva de ruptura para a mistura racêmica do rolipram para $c_{\text{mistura}} = 2,00$ mg/mL, $Q = 2,00$ mL/min e $\lambda = 254$ nm. (—) resposta do detector para os enantiômeros, (—) derivada da curva de resposta do detector, (.....) referências aos pontos de máximo da curva da derivada, (-----) referência ao ponto de mínimo da curva da derivada

A concentração correspondente ao primeiro máximo da derivada (primeira linha azul pontilhada, Figura 4.21) foi considerada como a concentração no platô intermediário. O segundo máximo (segunda linha azul pontilhada, Figura 4.21) referiu-se à concentração da mistura enantiomérica.

Para este experimento alimentou-se um volume de amostra igual a 14 mL (ou 7 minutos de alimentação). Como pode ser observado nas figuras mencionadas, em tempo próximo a 15 minutos, a coluna atingiu seu estado de saturação e, a partir de então, a concentração na saída passou a ser igual a da alimentação. A diferença existente entre os 7 minutos da alimentação e os 15 minutos para atingir o estado de equilíbrio é explicada pelo volume morto externo à coluna que a amostra tem que percorrer.

O processo de desorção baseou-se na mudança repentina da alimentação, que passou a ser composta unicamente pela fase móvel. Com menos de 30 minutos o sistema de análise praticamente não captava mais sinais de soluto.

Observando-se a Figura 4.23 pode-se acompanhar a concentração dos enantiômeros ao longo da construção da curva de ruptura. São mostrados perfis de eluição de 7 coletas consecutivas.

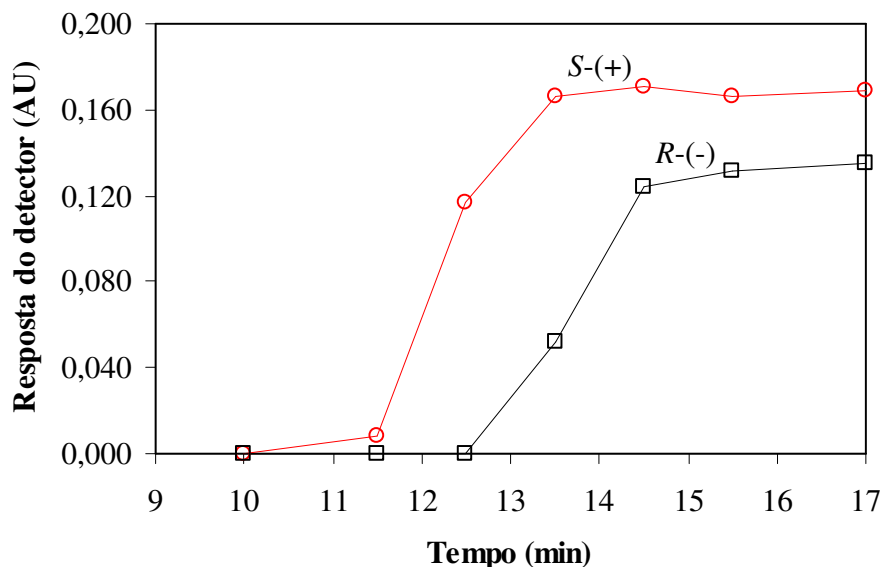


Figura 4.22. Análise de coletas realizadas durante a eluição dos enantiômeros sob concentração total da mistura 2,00 mg/mL. $Q = 2,00$ mL/min e $\lambda = 270$ nm. (—) enantiômero menos retido, (—) enantiômero mais retido.

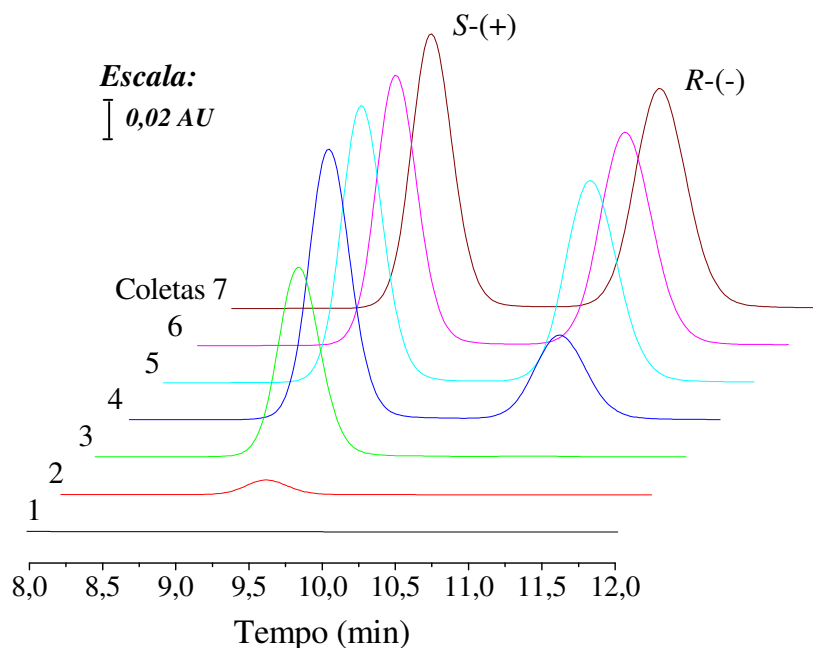


Figura 4.23. Perfis de eluição das 7 coletas da frente de adsorção durante a eluição dos enantiômeros do rolipram. $Q = 2,00$ mL/min e $\lambda = 270$ nm.

Este experimento foi repetido para as concentrações 0,50; 1,00 e 3,00 mg/mL nas mesmas condições experimentais, salvo para o comprimento de onda (λ) que, para as concentrações menores que 3,00 mg/mL, foi 254 nm. Para 3,00 mg/mL houve um estouro de escala do sistema de análise, sendo ajustado com λ igual a 300 nm, de menor absorvância para os enantiômeros. Com isso houve a necessidade de uma nova curva analítica.

As isotermas de equilíbrio obtidas para os enantiômeros do rolipram, na fase estacionária Kromasil® CHI-TBB, temperatura de 25°C e vazão 2,00 mL/min, são apresentadas na Figura 4.24. A concentração de soluto adsorvida na fase estacionária (q) em equilíbrio com a concentração de soluto na fase móvel (c), para cada enantiômero, foi calculada pela Equação 2.23.

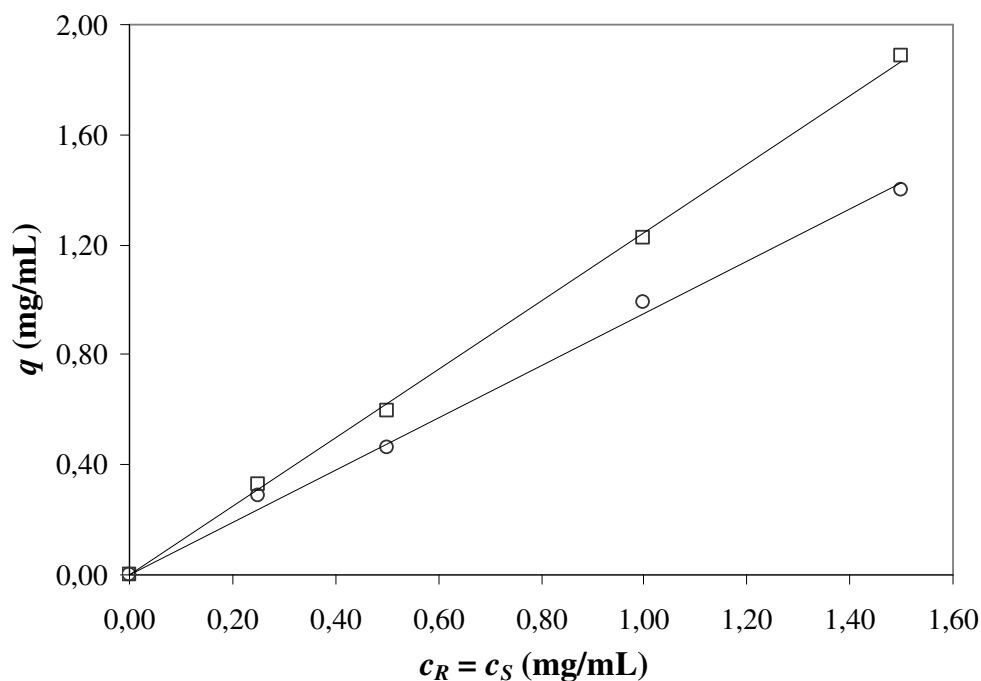


Figura 4.24. Isothermas de adsorção dos enantiômeros do rolipram em fase estacionária Kromasil® CHI-TBB a 25°C e $Q = 2,00$ mL/min obtidas pelo método da análise frontal. (□) $R(-)$ -rolipram e (○) $S(+)$ -rolipram.

Na faixa de concentração de alimentação estudada (até 3,00 mg/mL da mistura), os pontos experimentais foram ajustados por um modelo linear para os dois enantiômeros. A Tabela 4.10 contém os resultados referentes aos coeficientes angulares e de correlação das retas. Os coeficientes angulares correspondem às constantes de Henry para a região linear de separação. Estes resultados foram calculados em diferentes temperaturas e apresentados na Tabela 4.5 na forma de constante de equilíbrio de adsorção (K_p). A 25°C e 2,00 mL/min foram obtidos valores próximos a 0,938 e 1,377 para os enantiômeros $S(+)$ e $R(-)$, respectivamente. Comparando-se com os resultados da Tabela 4.10, nota-se que os valores são bastante próximos.

Tabela 4.10. Coeficientes angulares e coeficientes de correlação das isothermas lineares dos enantiômeros do rolipram.

rolipram	inclinação	r^2
S-(+)-rolipram	0,952	0,9960
R-(-)-rolipram	1,245	0,9991

4.6. SEPARAÇÃO DOS ENANTIÔMEROS

4.6.1. Separação em batelada

A separação dos enantiômeros do rolipram em um processo descontínuo, como em batelada, proporciona a obtenção de quantidades pequenas dos componentes, no entanto, suficientes para propósitos analíticos. A Figura 4.25 apresenta o perfil de eluição dos enantiômeros após alimentação de uma mistura racêmica de 8,0 g/L, a uma vazão de 1,00 mL/min por um tempo de 5 minutos. Pode-se notar boa separação dos componentes, sendo o fator de separação igual a 1,20. A Tabela 4.11 expõe os números de pratos, fatores de retenção e assimetria. Comparando-se estes valores com os das Tabelas 4.2 e 4.6, para 1,00 mL/min e 25°C, verifica-se aumento nos fatores de retenção e assimetria e diminuição do número de pratos. Isto se dá pela maior carga de soluto alimentada neste experimento de separação em batelada.

As frações correspondentes às coletas 1 e 2 foram injetadas no sistema, nas mesmas condições experimentais e seus perfis estão representados na Figura 4.26. O enantiômero S-(+), proveniente da coleta 1, foi obtido com 100% de pureza, como pode ser visto em (a). Por outro lado, na coleta 2 teve-se presença do enantiômero S-(+) com o R(-), sendo a pureza de 91,4% para o R(-).

Para melhorar a separação da segunda coleta, a fração coletada poderia ser realimentada ao sistema, tal como sugere Grill, Miller e Yan (2004). De acordo com estes autores, a eficiência de uma separação em batelada pode ainda ser aumentada por meio da alimentação direta da fração de interesse no sistema, como já discutido na Seção 2.13.

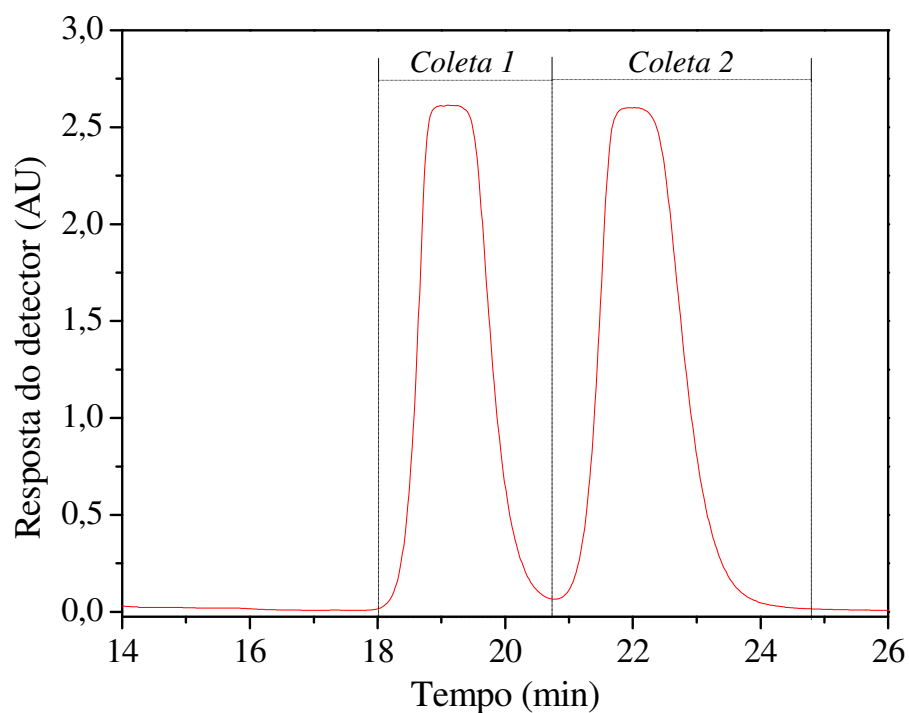


Figura 4.25. Perfil de eluição dos enantiômeros do rolipram na separação em batelada e representação das regiões de coleta de cada fração. $c_{\text{mistura}} = 8,0 \text{ g/L}$, $Q = 1,00 \text{ mL/min}$, $\lambda = 270 \text{ nm}$ e $T = 25^\circ\text{C}$.

Tabela 4.11. Parâmetros analíticos dos enantiômeros alcançados na separação em batelada.

<i>Enantiômero</i>	N_p	k	As
S-(+)-rolipram	3976	1,22	1,24
R-(-)-rolipram	3408	1,47	1,29

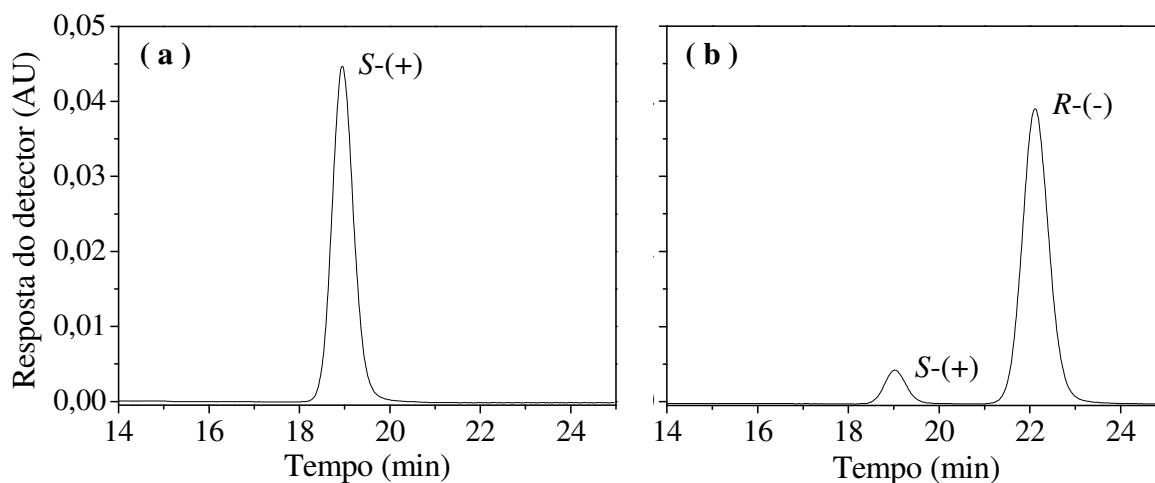


Figura 4.26. Perfis de eluição dos enantiômeros resultantes das análises correspondentes à (a) Coleta 1 e (b) Coleta 2. $Q = 1,00$ mL/min, $\lambda = 270$ nm e $T = 25^\circ\text{C}$.

4.6.2. *Estudo preliminar visando à separação contínua em Leito Móvel Simulado*

Caracterização das colunas cromatográficas

Foram caracterizadas, quanto aos parâmetros analíticos, oito colunas cromatográficas de iguais dimensões, contendo a mesma fase estacionária. Estes parâmetros serão utilizados para determinação da região de separação dos enantiômeros no sistema LMS. A Tabela 4.12 apresenta os tempos de retenção para os enantiômeros $S-(+)$, $R-(-)$ e para o composto inerte TTBB, além dos valores da porosidade total, calculados pela Equação 3.1. A porosidade total média alcançada indica alta fração de vazios e isto pode ser considerado ótimo para experimentos que exigem vazões elevadas, já que a queda de pressão torna-se menos acentuada. O baixo valor obtido para o desvio padrão (σ) dos valores demonstra uniformidade na seqüência de empacotamento das colunas.

Tabela 4.12. Valores de porosidade total para as oito colunas e os tempos de retenção dos enantiômeros e do composto inerte TTBB.

Colunas	$t_{R,S}$	$t_{R,R}$	$t_{R,TTBB}$	ϵ_T
1	9,581	11,172	5,781	0,585
2	9,611	11,274	5,806	0,588
3	9,688	11,424	5,778	0,585
4	9,857	11,540	5,869	0,594
5	9,551	11,120	5,842	0,591
6	9,897	11,512	5,936	0,601
7	9,873	11,506	5,980	0,605
8	9,794	11,477	5,924	0,599
Média	<i>9,731</i>	<i>11,378</i>	<i>5,864</i>	<i>0,593</i>
σ	<i>0,1409</i>	<i>0,1659</i>	<i>0,0759</i>	<i>0,0077</i>

As Equações 3.3 a 3.5 foram utilizadas, juntamente com os dados da Tabela 4.12, para o cálculo dos fatores de retenção, das constante de Henry e do fator de separação. Os resultados são apresentados na Tabela 4.13.

Nota-se que o desvio padrão (σ) dos valores de k_i , He_i e α para o conjunto de colunas mostrou-se pequeno. Isto é um indicativo da homogeneidade das colunas.

Tabela 4.13. Resultados alcançados nas oito colunas para os fatores de retenção, constantes de Henry e fatores de separação.

Colunas	k_S	k_R	He_S	He_R	α
1	0,662	0,939	0,933	1,323	1,419
2	0,660	0,948	0,940	1,350	1,437
3	0,681	0,984	0,959	1,385	1,444
4	0,684	0,972	1,000	1,423	1,422
5	0,639	0,909	0,924	1,315	1,423
6	0,672	0,945	1,011	1,423	1,408
7	0,655	0,930	1,005	1,426	1,419
8	0,658	0,943	0,984	1,412	1,435
Média	<i>0,664</i>	<i>0,946</i>	<i>0,969</i>	<i>1,382</i>	<i>1,426</i>
σ	<i>0,015</i>	<i>0,023</i>	<i>0,035</i>	<i>0,046</i>	<i>0,012</i>

Determinação da região de separação

A região de separação dos enantiômeros foi determinada por modelos baseados na teoria do equilíbrio (método do triângulo). Neste caso foram considerados dois modelos: o ideal e o não-ideal. Pelo modelo ideal desprezou-se qualquer efeito de transferência de massa e ainda considerou-se isoterma de equilíbrio de adsorção linear. Pelo modelo não-ideal considerou-se haver efeitos de transferência de massa e isoterma de equilíbrio de adsorção linear.

A validação dos programas computacionais utilizados para a geração da região de separação e perfis de concentração que serão apresentados foi realizada com base em dados da literatura (LEÃO; RODRIGUES, 2004; ZENONI et al., 2000) e dados experimentais do trabalho de Santos (2004).

As constantes de Henry utilizadas para os enantiômeros foram os valores médios obtidos a partir da caracterização das oito colunas ($He_S = 0,969$ e $He_R = 1,382$), como apresentado na Tabela 4.13. Adotando estes valores como sendo os valores limites para os parâmetros m_j , de acordo com o que foi apresentado na Seção 2.14.1, tem-se:

$$m_I > 1,382 \quad (4.1)$$

$$0,969 < m_{II} < 1,382 \quad (4.2)$$

$$0,969 < m_{III} < 1,382 \quad (4.3)$$

$$m_{IV} < 0,969 \quad (4.4)$$

Em simulações previamente realizadas para gerar a região de separação em diferentes valores de k_m , percebeu-se que os resultados mantiveram-se praticamente invariáveis para valores maiores que 2 min^{-1} . O mesmo ocorreu para valores de *Peclet* (Pe) maiores que 500. Com isso, adotaram-se estes valores para representar os efeitos de transferência de massa. O tempo de troca das posições das correntes de entrada e saída do sistema foi mantido em 20 minutos.

Fixando-se m_I e m_{IV} nos valores extremos dados pelas relações 4.1 e 4.4, pôde-se gerar a região no plano (m_{II} , m_{III}) que indica a completa separação dos enantiômeros de acordo com os modelos ideal e não ideal. Esta região é mostrada na Figura 4.27. O triângulo retângulo representado pela linha preta limita a região de completa separação baseado no modelo ideal. O modelo não ideal foi utilizado para gerar a região de separação atendendo diferentes critérios de pureza. A projeção limitada pela linha azul define a região de separação para uma pureza de 90%, a linha verde corresponde à pureza de 95% e a vermelha 98,5%. Nota-se que quanto maior a restrição para a pureza requerida, menor a região de separação.

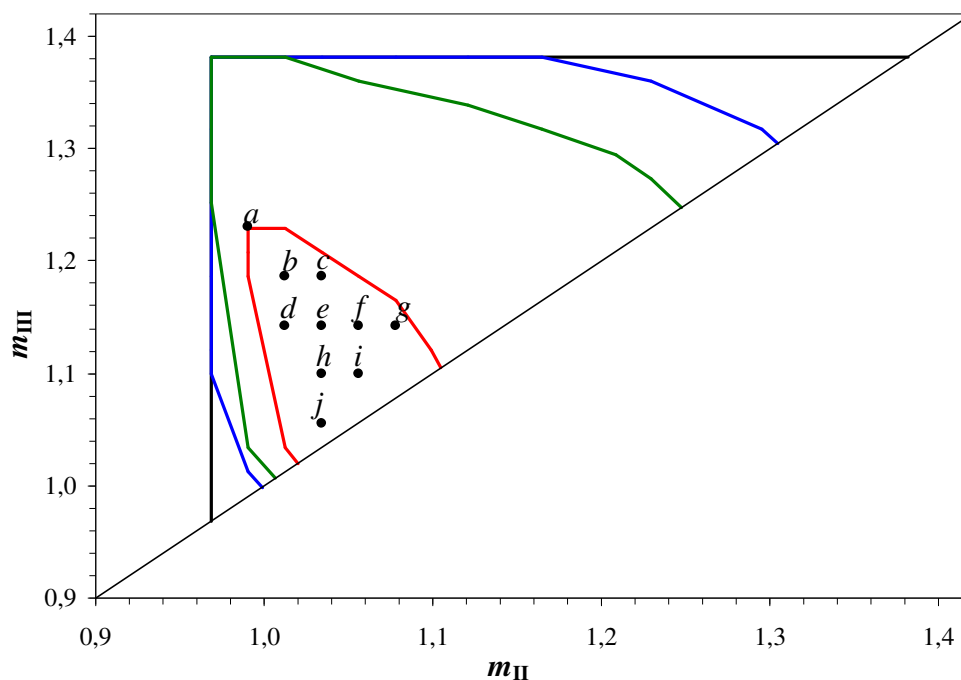


Figura 4.27. Regiões de separação dos enantiômeros no plano (m_{II} , m_{III}) de acordo com a Teoria do Equilíbrio: (—) completa separação para o modelo ideal, (—) separação pelo modelo do LMV para pureza de 90%, (—) separação pelo modelo do LMV para pureza de 95%, (—) separação pelo modelo do LMV para pureza de 98,5%, (•) pontos avaliados em termos das variáveis de desempenho.

Análise das variáveis de desempenho na região de separação

Adotou-se pontos representativos de m_{II} e m_{III} dentro da região que define maior pureza. Estes pontos estão nomeados pelas letras de a a j na Figura 4.27. As condições dadas por estes pontos alimentaram a simulação do estado estacionário, de acordo com o modelo não ideal, e permitiu a determinação das variáveis de desempenho produtividade (Pr_i), recuperação (Rec_i) e consumo de solvente (CS_i), em cada situação, já que a pureza nesta região é superior a 98,5%. Os resultados referentes a estas simulações são apresentados na Tabela 4.14. Este estudo foi realizado com o intuito de avaliar o comportamento destas variáveis para diferentes condições de m_{II} e m_{III} .

Tabela 4.14. Variáveis de desempenho para as condições escolhidas na região de separação correspondente a 98,5% de pureza.

<i>Condição</i>	m_{II}	m_{III}	P_{ext}	P_{ref}	Pr_{ext}	Pr_{ref}	Rec_{ext}	Rec_{ref}	CS
<i>a</i>	0,991	1,230	98,50	98,74	0,884	0,841	96,53	91,85	13,56
<i>b</i>	1,013	1,186	99,70	98,77	0,643	0,594	96,60	89,32	17,90
<i>c</i>	1,034	1,186	99,95	98,67	0,562	0,511	96,40	87,74	20,18
<i>d</i>	1,013	1,143	99,63	98,98	0,484	0,433	96,83	89,92	23,20
<i>e</i>	1,034	1,143	99,94	98,90	0,403	0,354	96,63	85,02	27,45
<i>f</i>	1,056	1,143	99,99	98,80	0,322	0,277	96,42	83,17	33,79
<i>g</i>	1,078	1,143	99,99	98,70	0,240	0,204	96,17	81,46	44,44
<i>h</i>	1,034	1,099	99,93	99,13	0,242	0,202	96,86	80,77	44,44
<i>i</i>	1,056	1,099	99,99	99,05	0,161	0,130	96,66	78,50	65,59
<i>j</i>	1,034	1,056	99,90	99,36	0,081	0,061	97,09	73,18	129,61

Unidades das variáveis de desempenho: pureza e recuperação - valores percentuais; produtividade - grama de soluto por litro de sólido por dia; consumo de solvente - litro de solvente por grama de soluto.

De acordo com a Tabela 4.14 a condição *a* apresentou maior produtividade e menor consumo de solvente; situação bastante favorável. No entanto, sabe-se que, por ser um ponto localizado na extremidade, qualquer variação nas vazões das correntes no sistema desloca o ponto para fora da região. Isso eleva o grau de contaminação de uma ou outra corrente, dependendo para onde o ponto deslocar.

Os resultados obtidos para a recuperação permaneceram praticamente constantes para a corrente de extrato e diminuíram para a corrente de refinado à medida que os pontos se aproximavam da diagonal. As maiores purezas para ambos enantiômeros foram alcançadas nos pontos mais próximos à linha diagonal do gráfico. Em consequência, nestes pontos têm-se as menores produtividades e o maior consumo de solvente. Este

comportamento para a produtividade era esperado, pois a diferença entre m_{III} e m_{II} está diretamente relacionada à vazão de alimentação da amostra. Se $(Q_j)_{LMS}$ for isolado na Equação 2.33, sendo $j = II$ e III , e subtraído tal como a Equação 2.47, tem-se que: $Q_A = Q_S(1 - \varepsilon_p)(m_{III} - m_{II})$. O produto $Q_S(1 - \varepsilon_p)$ trata-se da vazão de sólido e mantém-se fixa, já que no nosso caso a vazão de sólido é determinada pelo tempo de troca das posições de entrada e saída.

A relação da produtividade (Pr) e do consumo de solvente (CS) como função da diferença ($m_{III} - m_{II}$) para as condições da Tabela 4.14 é acompanhada na Figura 4.28. Quanto maior esta diferença, conseqüentemente maior a alimentação de amostra, tem-se melhores desempenhos para Pr e CS . No entanto, haverá um momento em que a pureza diminuirá, pois a condição terá saído da região adotada para a separação de ambos enantiômeros (Figura 4.27).

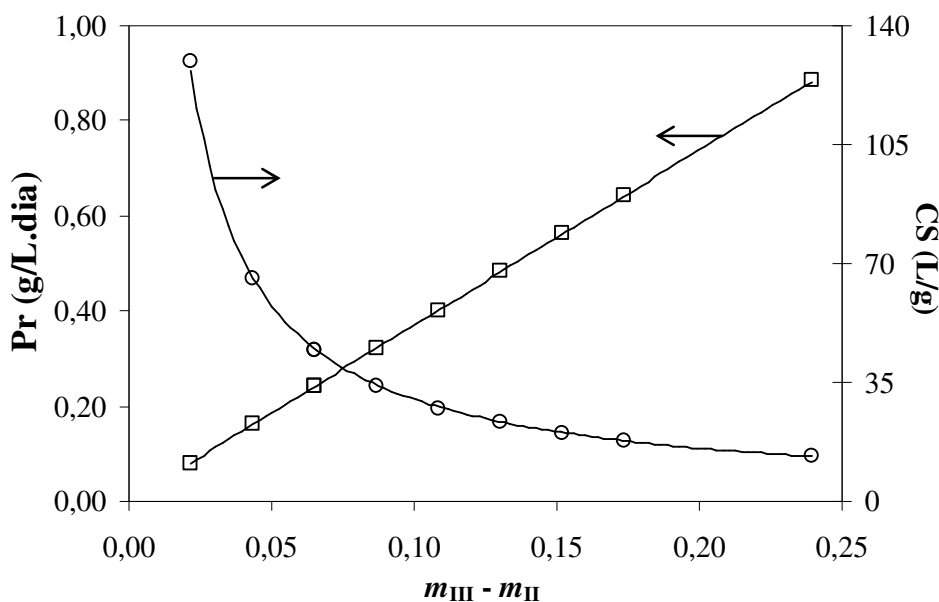


Figura 4.28. Produtividade e consumo de solvente como função da diferença ($m_{III} - m_{II}$).

Determinação das vazões

Escolheu-se a condição *b* como sendo a de melhor desempenho, com valores de pureza satisfatórios, alta produtividade, baixo consumo de solvente e com recuperação relativamente alta, para ambos enantiômeros. Com seus valores de m_{II} e m_{III} calcularam-se as vazões das seções II e III da unidade, respectivamente, de acordo com a Equação 2.34. Para calcular as vazões das seção I e IV, atribuíram-se valores a estas variáveis e calcularam-se os valores de m_I e m_{IV} , pela mesma Equação 2.34, de tal forma que eles obedecessem as restrições dadas pela Equações 4.1 e 4.4. Os resultados são apresentados na Tabela 4.15. O tempo de troca foi 15 minutos. Valores maiores que este resultariam em vazões de alimentação muito pequenas.

Tabela 4.15. Parâmetros m_j e vazões nas seções para a condição *b*.

<i>Parâmetros m_j</i>				<i>Vazões nas seções j (mL/min)</i>			
m_I	m_{II}	m_{III}	m_{IV}	Q_I	Q_{II}	Q_{III}	Q_{IV}
1,556	1,013	1,186	0,222	1,70	1,41	1,51	1,00

Determinaram-se as vazões das correntes de extrato, refinado e alimentação pelo balanço de massa representado pelas Equações 2.45, 2.46 e 2.47, respectivamente. Os resultados destas variáveis são visualizados na Tabela 4.16.

Tabela 4.16. Vazões nas correntes de alimentação e saídas da unidade LMS.

<i>Corrente</i>	<i>Vazão (mL/min)</i>
Alimentação	0,10
Extrato	0,29
Refinado	0,51

Avaliação da separação contínua

Com base nas vazões apresentadas na Tabela 4.16 fez-se a avaliação do estado transiente, por meio do programa computacional (modelagem matemática para o LMS), para uma concentração de alimentação de 0,50 mg/mL da mistura racêmica. Para esta concentração, sabe-se que o comportamento do equilíbrio de adsorção é linear (Figura 4.24). Para considerar o baixo efeito dos fenômenos de transferência de massa, verificados na Seção 4.4.4, foram utilizados altos valores de *Peclet* para os enantiômeros.

O perfil de concentração das correntes de extrato e refinado, ao longo do tempo, são apresentados na Figura 4.29. As linhas vermelhas representam o enantiômero mais retido [*R*-(-)-rolipram] e as azuis o menos retido [*S*-(+)-rolipram]. As linhas grossas em cada perfil correspondem aos valores médios ao longo do tempo. Como já esperado a corrente de extrato manteve-se rica do enantiômero *R*-(-), mostrando apenas traços do enantiômero *S*-(+). Conseqüentemente, a corrente de refinado mostrou-se com maior concentração do enantiômero *S*-(+).

As purezas alcançadas em cada corrente foram calculadas com base nas concentrações médias de cada enantiômero, considerando-se que, com 1200 minutos o sistema já havia alcançado o estado estacionário. De fato isto acontece, já que praticamente não ocorre variação em termos de tempo ou concentração nos perfis internos do ciclo 9 para o 10, como pode ser notado na Figura 4.30. Nesta figura, as linhas vermelhas são para o ciclo 1, as azuis para o 2, as verdes para o 9 e a preta para o 10, de forma que as grossas representam o enantiômero mais retido.

Em números, a corrente de extrato obteve pureza de 99,99% para o enantiômero *R*-(-) e a corrente de refinado 96,74% para o enantiômero *S*-(+). Estes resultados estão bastante próximos aos da Tabela 4.14. Apenas a pureza para o refinado apresentou-se pouco abaixo aos 98,5% estipulados inicialmente. Isto por conta de diferenças numéricas associadas aos dois modelos utilizados para chegar a estes resultados.

A Figura 4.31 apresenta perfis internos no decorrer do último ciclo. As linhas grossas contínuas correspondem ao enantiômero mais retido ou *R*-(-) e as finas tracejadas ao menos retido ou *S*-(+), de forma que: as linhas azuis correspondem a 25% do ciclo, as vermelhas 50% e as verdes 75%.

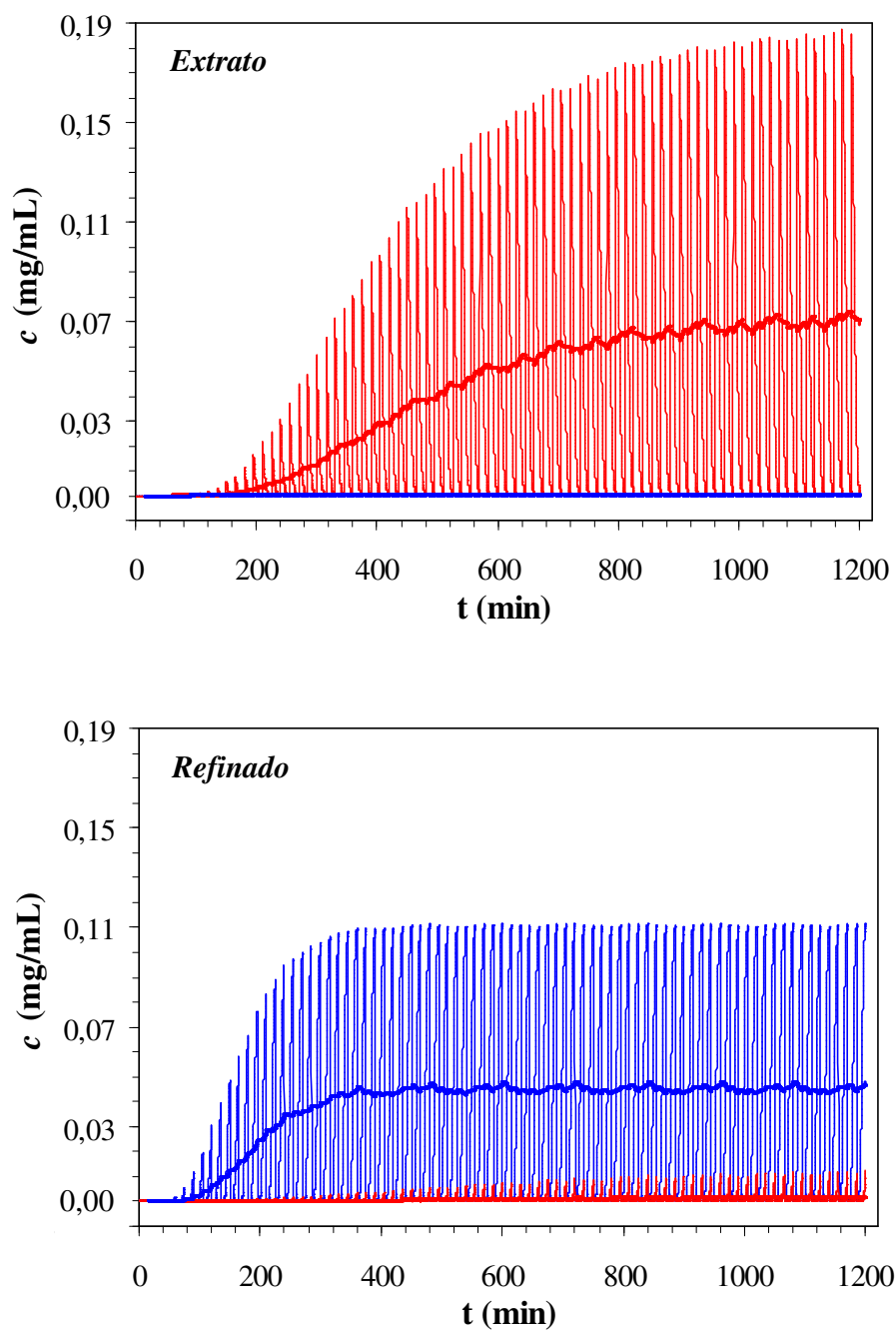


Figura 4.29. Perfil de eluição dos enantiômeros do rolipram nas correntes de extrato e refinado. (—) $R(-)$ -rolipram, (—) $S(+)$ -rolipram. Linhas grossas correspondem às médias.

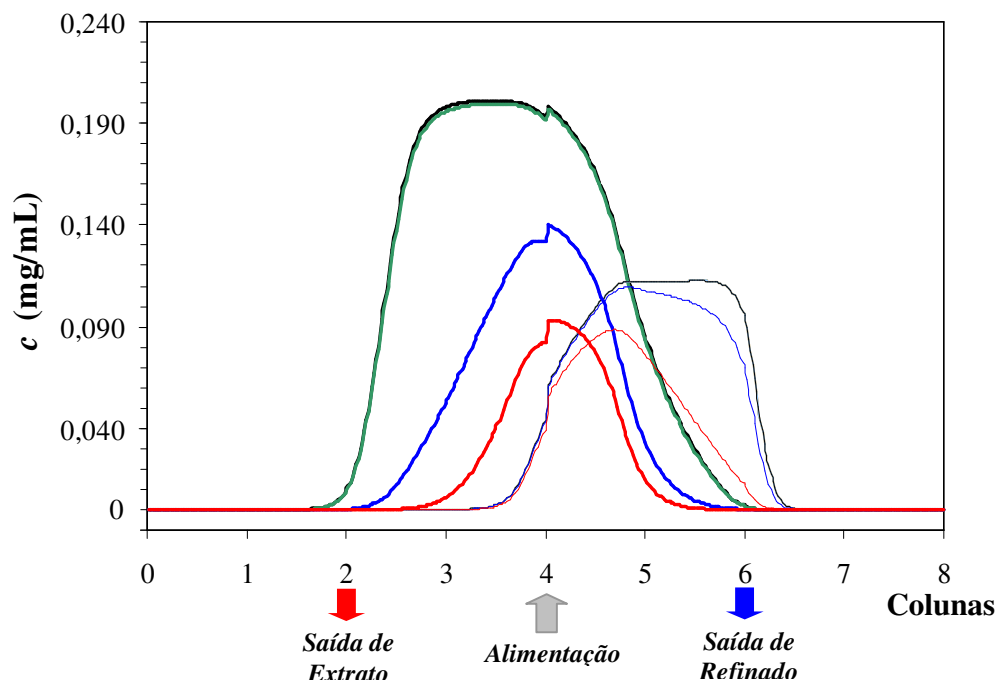


Figura 4.30. Perfil interno para: (—) ciclo 1; (—) ciclo 2; (—) ciclo 9; (—) ciclo 10. Linhas grossas para R-(-)-rolipram e linhas finas para S-(+)-rolipram.

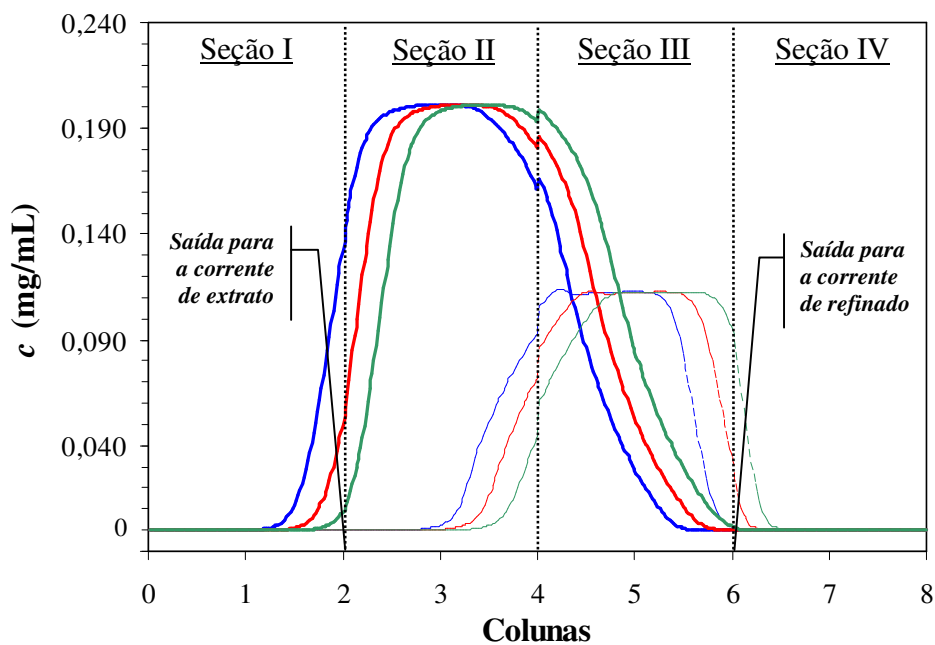


Figura 4.31. Perfil interno da unidade. Linhas contínuas: R-(-)-rolipram, linhas tracejadas: S-(+)-rolipram, azuis: 25% do ciclo, vermelhas: 50% do ciclo, verdes: 75% do ciclo.

Imediatamente após a coluna 2 (seção I) ocorre a coleta de extrato e, pode-se observar na Figura 4.31 que neste ponto apenas o enantiômero *R*-(-) encontra-se presente, comprovando o alto grau de pureza da corrente. Da mesma forma que, após a coluna 6 (seção III) há coleta do refinado e, neste caso, o enantiômero *R*-(-) é contaminante e traços dele saem junto com o menos retido *S*-(+).

Observa-se na Figura 4.31 que, na condição operacional avaliada, duas das oito colunas estão inutilizadas. A coluna 1 (seção I) e a coluna 8 (seção IV) não contribuem para a separação dos enantiômeros.

Capítulo 5

O Capítulo 5 finaliza o trabalho apresentando as conclusões que foram verificadas após a análise dos resultados, tendo em vista o caminho traçado pelos objetivos inicialmente apresentados. Também são apresentadas algumas sugestões para trabalhos que poderão ser realizados com base neste ou ainda trabalhos relacionados com o assunto.

5.1. CONCLUSÕES

Os resultados alcançados com o trabalho demonstraram a alta eficiência de separação dos enantiômeros do rolipram na fase estacionária *O,O'*-bis[4-*terc*-butilbenzoil]-*N,N'*-dialil-L-tartardiamida, com destaque para a condição de 1,00 mL/min e 45°C que, no processo de separação resultou em mais de 9000 pratos. A fase móvel definida como adequada para os experimentos baseou-se em MTBE/EtOAc/EtOH (60/35/5, v/v) e maior sensibilidade para o rolipram no sistema de detecção foi alcançado em torno de 280 nm. Com o auxílio do dicroísmo circular pôde-se verificar que o enantiômero menos retido na coluna cromatográfica trata-se do (*S*)-(+)-rolipram e o mais retido (*R*)-(-)-rolipram.

Os parâmetros analíticos de separação demonstraram o grande potencial de separação dos enantiômeros, com fatores de separação superiores a 1,40 na maioria das condições experimentais testadas. Os coeficientes de transferência de massa foram favoráveis à separação, apresentando altos valores de k_m e baixos valores de D_L/u_0 , impondo baixa resistência à transferência de massa.

As variáveis vazão de fase móvel e temperatura mostraram atuar diretamente na resolução da separação. Picos mais resolvidos foram alcançados nas condições de baixas vazão e temperatura.

Os valores negativos para as grandezas termodinâmicos comprovaram que é favorável energeticamente aos solutos adsorverem-se à fase estacionária e, isto ocorre com predomínio da energia entálpica.

As isotermas de adsorção, determinadas até a concentração de 3,0 mg/mL da mistura racêmica, adequaram-se bem ao ajuste de uma reta, mostrando assim, que até esta concentração o comportamento obedece à lei de equilíbrio linear.

A caracterização de oito colunas cromatográficas, disponíveis para separação contínua, demonstrou uniformidade das mesmas, quanto à porosidade total e aos parâmetros analíticos de separação. Este é um fato muito importante para a utilização do conjunto de colunas no sistema LMS.

Partindo-se dos parâmetros analíticos determinados para o conjunto de colunas, gerou-se a região de separação dos enantiômeros para diferentes restrições de pureza. Analisando-se, em termos das variáveis desempenho, vários pontos no interior de uma região de separação adotada, comprovou-se que maiores produtividades com menor consumo de solvente para um sistema contínuo são alcançadas próximo ao vértice do triângulo no plano (m_{II} , m_{III}). A simulação do processo de separação no LMS, partindo-se das condições operacionais geradas por um ponto próximo ao vértice resultou em uma corrente de extrato com 99,99% de pureza para o enantiômero *R*-(-) e uma de refinado com 96,74% de pureza para o *S*-(+). Neste caso, a produtividade manteve-se próxima a 0,6 g/L.dia.

Como conclusão geral tem-se que, em virtude dos resultados satisfatórios alcançados com a etapa de simulação do processo em LMS, é recomendada a realização experimental da separação, obedecendo às condições pré-estabelecidas pela simulação.

5.2. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para trabalhos futuros ou relacionados a este assunto fica como sugestão avaliar o desempenho de separação do rolipram em colunas empacotadas com fase estacionária tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose (Chiracel-OD), uma vez que há relatos na literatura deste fato (KÜSTERS; SPÖNDLIN, 1996).

Tendo a possibilidade de obtenção de quantidades significativas de rolipram, uma sugestão é a determinação do efeito competitivo dos enantiômeros pelos sítios de adsorção para a região não linear da isoterma de adsorção. Uma vez com estes resultados, avaliar seus ajustes a diferentes modelos de isotermas, principalmente Langmuir competitivo.

Realizar um estudo de sobrecarga na coluna, por meio da injeção de altos volumes de amostra e, com isso, determinar a capacidade de saturação da mesma.

No entanto, a grande sugestão para um trabalho futuro é a realização experimental da separação do rolipram no sistema de Leito Móvel Simulado, tendo como base as condições operacionais descritas nesta pesquisa. Isto não foi possível de se realizar, até o presente momento, por conta de problemas nas válvulas de alívios que compõem a unidade. A fase móvel dissolvia as borrachas de vedação e inviabilizava a operação. Isso pode ser contornado trocando-se as borrachas por outras mais resistentes aos solventes ou até pela adoção de controladores de vazão nas saídas do sistema.

Capítulo 6

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLENMARK, S. G.; ANDERSSON, S.; MÖLLER, P.; SANCHEZ, D. A new class of network-polymeric chiral stationary phases. **Chirality**, v. 7, p. 248-256, 1995.

ANDERSSON, S.; ALLENMARK, S.; MÖLLER, P.; PERSSON, B.; SANCHEZ, D. Chromatographic separation of enantiomers on N,N'-diallyl-L-tartardiamide-based network-polymeric chiral stationary phases. **Journal of Chromatography A**, v. 741, p. 23-31, 1996.

ANDERSSON, S.; BALMÉR, K.; PERSSON, B. Chromatographic resolution of organic acids using the Kromasil-CHI-TBB chiral stationary phase. **Chirality**, v. 11, p. 420-425, 1999.

ARNOLD, F. H.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. Analysis of affinity separations II: The characterizations of affinity columns by pulse techniques. **Chemical Engineering Journal**, v. 30, p. 25-36, 1985a.

_____. Liquid chromatography plate height equations. **Journal of Chromatography**, v. 330, p. 159-166, 1985b.

AZEVEDO, D. C. S; RODRIGUES A. E. Design of a simulated moving bed in the presence of mass-transfer resistances. **American Institute of Chemical Engineers Journal**, v. 45, n. 5, p. 956-966, 1999.

BARAD, M.; BOURTCHOULADZE, R.; WINDER, D. G.; GOLAN, H.; KANDEL, E. Rolipram, a type IV-specific phosphodiesterase inhibitor, facilitates the establishment of long-lasting long-term potentiation and improves memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, p. 15020-15025, 1998.

BARRETO JR; A. G. **Projeto de sistemas cromatográficos para a separação de lapachol**. 2005. 142 p. Tese (Doutorado) – COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

BERTHOD, A.; HE, B. L.; BEESLEY, T. E. Temperature and enantioseparation by macrocyclic glycopeptide chiral stationary phases. **Journal of Chromatography A**, v. 1060, p. 205-214, 2004.

BLANCO, M.; COELHO, J.; ITURRIAGA, H.; MASPOCH, S.; PORCEL, M. Use of circular dichroism and artificial neural networks for the kinetic-spectrophotometric resolution of enantiomers. **Analytica Chimica Acta**, v. 431, p. 115-123, 2001.

BÖCKER, S.; MAZZOTTI, M.; MORBIDELLI, M.; FLEURY, C.; SCHENKEL, B. Design of chromatographic separations on reversed phase. **Separation Science and Technology**, v. 37, n. 7, p. 1725-1745, 2002.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação**. São Carlos: Editora da UFSCar, Série Apontamentos, 2001.

CASS, Q. B.; TIRITAN, M. E.; BASSI, A. L.; CALAFATTI, S. A.; DEGANI, A. L. G. Discriminação quiral por CLAE em carbamatos de polissacarídeos: desenvolvimento, aplicações e perspectivas. **Química Nova**, v. 20, p. 49-57, 1997.

CAVAZZINI, A.; FELINGER, A.; KACZMARSKI, K.; SZABELSKI, P.; GUIOCHON, G. Study of the adsorption equilibria of the enantiomers of 1-phenyl-1-propanol on cellulose tribenzoate using a microbore column. **Journal of Chromatography A**, v. 953, p. 55-66, 2002.

CHING, C. B.; RUTHVEN, D. M. An experimental study of a simulated counter-current adsorption system-I. isothermal steady state operation. **Chemical Engineering Science**, v. 40, p. 877-885, 1985.

CIRILLI, R.; La TORRE, F. Stereoselective analysis of benazepril and its stereoisomers by reversed-phase high-performance liquid chromatography on a chiral AGP column. **Journal of Chromatography A**, v. 818, p. 53-60, 1998.

COLLINS C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, São Paulo, 2006. 453 p.

COX, G. B. **Preparative enantioselective chromatography**. 1st ed. Oxford: Blackwell Publishing, United Kingdom, 2005. 330 p.

DAL PIAZ, V.; GIOVANNONI, M. P. Phosphodiesterase 4 inhibitors, structurally unrelated to Rolipram, as promising agents for the treatment of asthma and other pathologies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 35, p. 463-480, 2000.

DEMnitz, J.; La VECCHIA, L.; BACHER, E.; KELLER, T. H.; MÜLLER T.; SCHÜRCH, F.; WEBER, H. P.; POMBO-VILAR, E. Enantiodivergent synthesis of (R)- and (S)-rolipram. **Molecules**, v. 3, p. 107-119, 1998.

DUAN, G.; CHING, C. B.; SWARUP, S. Kinetic and equilibrium study of the separation of propranolol enantiomers by high performance liquid chromatography on a chiral adsorbent. **Chemical Engineering Journal**, v. 69, p. 111-117, 1998.

EKA CHEMICALS; <<http://www.kromasil.com/products/products/chiral/index.html>>. Acesso em: 27 jun. 2006.

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Center for Drug Evaluation and Research. USFDA's Policy statement for the development of new stereoisomeric drugs. May 1, 1992. Disponível em: <<http://www.fda.gov/cder/guidance/stereo.htm>>. Acesso em: 28 jun. 2006.

FELINGER, A.; ZHOU, D.; GUIOCHON, G. Determination of the single component and competitive adsorption isotherms of the 1-indanol enantiomers by the inverse method. **Journal of Chromatography A**, v. 1005, p. 35-49, 2003.

FRANCOTTE, E. R. Contribution of preparative chromatographic resolution to the investigation of chiral phenomena. **Journal of Chromatography A**, v. 666, p. 565-601, 1994.

_____. Enantioselective chromatography as a powerful alternative for the preparation of drugs enantiomers. **Journal of Chromatography A**, v. 906, p. 379-397, 2001.

FRANCOTTE, E. R.; JUNKER-BUCHHEIT, A. Preparative chromatography separation of enantiomers. **Journal of Chromatography**, v. 576, p. 1-45, 1992.

FRANCOTTE, E. R.; RICHERT, P.; MAZZOTTI, M.; MORBIDELLI, M. Simulated moving bed chromatographic resolution of a chiral antitussive. **Journal of Chromatography A**, v. 796, p. 239-248, 1998.

GARCIA, A. L. L.; CARPES, M. J. S.; OCA, A. C. B. M.; SANTOS, M. A. G.; SANTANA, C. C.; CORREIA, C. R. D. Synthesis of 4-aryl-2-pyrrolidones and β -aryl- γ -amino-butyric acid (GABA) analogues by heck arylation of 3-pyrrolines with arenediazonium tetrafluoroborates. Synthesis of (\pm)-rolipram on a multigram scale and chromatography resolution by semipreparative chiral simulated moving bed chromatography. **Journal of Organic Chemistry**, v. 70, p. 1050-1053, 2005.

GIOVANNI, O. **Preparative chromatography using supercritical fluids**. 2000. 159 p. Thesis (Doctor) – Swiss Federal Institute of Technology Zurich, Zurich, Switzerland.

GOOSSENS, J. F.; FOULON, C.; BAILLY, C.; BIGG, D. C. H.; BONTE, J. P.; VACCHER, C. Chiral resolution of enantiomers of homocamptothecin derivatives, antitumor topoisomerase I inhibitors, using high performance liquid chromatography on polysaccharide-based chiral stationary phases. **Chromatographia**, v. 59, p. 305-313, 2004.

GÖTMAR, G.; ALBAREDA, N. R.; FORNSTEDT, T. Investigation of the heterogeneous adsorption behavior of selected enantiomers on immobilized α_1 -acid glycoprotein. **Analytical Chemistry**, v. 74, p. 2950-2959, 2002.

GRILL, C. M.; MILLER, L.; YAN, T. Q. Resolution of a racemic pharmaceutical intermediate: A comparison of preparative HPLC, steady state recycling and simulated moving bed. **Journal of Chromatography A**, v. 1026, p. 101-108, 2004.

GUIOCHON, G. Preparative liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 965, p. 129-161, 2002.

GUIOCHON, G.; SHIRAZI, S. G.; KATTI, A. M. **Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography**. Boston: Academic Press, MA, 1994. 701 p.

HEASLIP, R. J.; EVANS, D. Y. Emetic, central nervous system and pulmonary activities of rolipram in the dog. **European Journal of Pharmacology**, v. 286, p. 281-290, 1995.

HENDERSON, G. M.; RULE, H. G. *Journal of Chemical Society*, 1568, 1939.

JACOBSON, J. M.; JOHN, H. F.; HORVÁTH, C. Measurement of competitive adsorption isotherms by frontal chromatography. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 26, p. 43-50, 1987.

JACOBSON, J. M.; FRENZ, J.; HORVÁTH, C. Measurement of adsorption isotherms by liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 316, p. 53-68, 1984.

JAMES, E. A. **The application of multicomponent adsorption theory to an ion-exchange chromatography system for recovery of whey proteins**. 1994. Thesis (PhD) – The University of Queensland, Brisbane, Australia.

JUZA, M.; MAZZOTTI, M.; MORBIDELLI, M. Simulated moving-bed chromatography and its application to chirotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 18, p. 108-118, 2000.

KABIR, H.; GREVILLOT, G.; TONDEUR, D. Equilibria and activity coefficients for non-ideal adsorbed mixtures from perturbation chromatography. **Chemical Engineering Science**, v. 53, n. 9, p. 1639-1654, 1998.

KATO, H.; ARAKI, T.; ITOYAMA, Y.; KOGURE, K. Rolipram, a cyclic AMP-selective phosphodiesterase inhibitor, reduces neuronal damage following cerebral ischemia in the gerbil. **European Journal of Pharmacology**, v. 272, p. 107-110, 1995.

KENNEDY, J. H.; BELVO, M. D.; WILLIAMS, J. D. Comparison of separation efficiency of early phase active pharmaceutical intermediates by steady state recycle and batch chromatographic techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1046, p. 55-60, 2004.

KRIJGSMAN, J. **Product recovery in bioprocess technology**. 1st ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, England, 1992. 285 p.

KÜSTERS, E.; SPÖNDLIN, C. Influence of temperature on the enantioseparation of rolipram and structurally related racemates on Chiracel-OD. **Journal of Chromatography A**, v. 737, p. 333-337, 1996.

LEÃO, C. P.; RODRIGUES, A. E. Transient and steady-state models for simulated moving bed processes: numerical solutions. **Computers and Chemical Engineering**, v. 28, p. 1725-1741, 2004.

LIM, B. G.; CHING, C. B.; TAN, R. B. H. Determination of competitive adsorption isotherms of enantiomers on a dual-site adsorbent. **Separations Technology**, v. 5, p. 213-228, 1995.

LINDHOLM, J.; FORNSTEDT, T. Investigation of the adsorption behaviour of a chiral model compound on a tartardiamide-based network-polymeric chiral stationary phase. **Journal of Chromatography A**, v. 1095, p. 50-59, 2005.

LÖWENDAHL, A. C.; ALLENMARK, S. G. Liquid chromatography resolution of cyclic sulfoximides and their sulfoxide precursors on an *N,N'*-dialil-L-tartardiamide-based chiral stationary phase. **Chirality**, v. 9, p. 167-172, 1997.

MACHERY-NAGEL; **Guia para colunas cromatográficas**, p. 62-66, 2000.

MAIER, N. M.; FRANCO, P.; LINDER, W. Separation of enantiomers: needs, challenges, perspectives. **Journal of Chromatography A**, v. 906, p. 3-33, 2001.

MALISKA, C. L. **Transferência de calor e mecânica dos fluidos computacional**. 2a ed. Rio de Janeiro: LTC, 2004. 472 p.

MAZZOTTI, M.; STORTI, G.; MORBIDELLI, M. Countercurrent adsorption separation processes-II Multicomponent systems. **American Institute of Chemical Engineers Journal**, v. 40, p. 1825-1842, 1994.

_____. Optimal operation of simulated moving bed units for nonlinear chromatographic separations. **Journal of Chromatographic A**, v. 769, p. 3-24, 1997a.

_____. Supercritical fluid simulated moving bed chromatography. **Journal of Chromatographic A**, v. 786, p. 309-320, 1997b.

MERCK INDEX, 12th ed. 8410, 1996.

MIGLIORINI, C.; MAZZOTTI, M.; MORBIDELLI, M. Continuous chromatographic separation through simulated moving beds under linear and nonlinear conditions. **Journal of Chromatography A**, v. 827, p. 161-173, 1998.

MILLER, L.; ORIHUELA, C.; FRONEK, R.; HONDA, D.; DAPREMONT, O. Chromatographic resolution of the enantiomers of a pharmaceutical intermediate from the milligram to the kilogram scale. **Journal of Chromatography A**, v. 849, p. 309- 317, 1999.

MIHLBACHLER, K.; KACZMARSKI, K.; SIEDEL-MORGENSTERN, A.; GUIOCHON, G. Measurement and modeling of the equilibrium behavior of the Tröger's base enantiomers on a amylose-based chiral stationary phase. **Journal of Chromatography A**, v. 955, p. 35-52, 2002.

MIYABE, K.; GUIOCHON, G. Kinetic Study of the Concentration Dependence of the Mass Transfer Rate Coefficient in Anion-Exchange Chromatography of Bovine Serum Albumin. **Biotechnology Progress**, v. 15, p. 740-752, 1999.

MIYABE, K.; SUZUKI, M. Chromatography of liquid-phase adsorption on octadecylsilyl-silica gel. **American Institute of Chemical Engineers Journal**, v. 38, p. 901-910, 1992.

NIBUYA, M.; NESTLER, E. J.; DUMAN, R. S. Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus. **The Journal of Neuroscience**, v. 16, n. 7, p. 2365-2372, 1996.

OKAMOTO, Y., KAIDA, Y. Resolution by high-performance liquid chromatography using polysaccharide carbamates and benzoates as chiral stationary phases. **Journal of Chromatography A**, v. 666, p. 403-419, 1994.

PARK, J. H.; LEE, J. W.; KWON, S. H.; CHA, J. S.; CARR, P. W.; McNEFF, C. V. Separation of racemic 2,4-dinitrophenyl amino acids on 9-O-(phenyloxycarbonyl)quinine-bonded carbon-clad zirconia in reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1050, p. 151-157, 2004.

PEARSE, D. D.; PEREIRA, F. C.; MARCILLO, A. E.; BATES, M. L.; BERROCAL, Y. A.; FILBIN, M. T.; BUNGE, M. B. *cAMP* and Schwann cells promote axonal growth and functional recovery after spinal cord injury. **Nature Medicine**, v. 10, p. 601-601, 2004.

REKOSKE, J. A. Chiral Separation. **American Institute for Chemical Engineers Journal**, v. 47, n. 1, p. 2-5, 2001.

RODRIGUES, A. E.; PAIS, L. S. Design of SMB chiral separations using the concept of separation volume. **Separation Science and Technology**, v. 39, n. 2, p. 245-270, 2004.

ROJKOVIČOVÁ, T.; LEHOTAY, J.; KRUPCIK, J.; FEDURCOVÁ, A.; CIZMARIK, J.; ARMOSTRONG, D. W. Study of the mechanism of enantioseparation. VII. Effect of temperature on retention of some enantiomers of phenylcarbamic acid derivatives on a teicoplanin aglycone chiral stationary phase. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 27, n. 11, p. 1653-1670, 2004.

RUTHVEN, D. M. **Principles of Adsorption and Adsorption Process**. New York: John Wiley & Sons, 1984. 433 p.

RUTHVEN, D. M.; CHING, C. B. Counter-current and simulated counter-current adsorption separation processes. **Chemical Engineering Science**, v. 44, p. 1011-1038, 1989.

SANTOS, M. A. G. **Separação dos enantiômeros do anestésico cetamina por cromatografia contínua em leito móvel simulado**. 2004. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

SANTOS, M. A. G.; VEREDAS, V.; SILVA JR, I. J.; CORREIA, C. R. D.; FURLAN, L. T.; SANTANA, C. C. Simulated Moving-Bed adsorption for separation of racemic mixtures. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 21, n. 1, p. 127-136, 2004.

SCHÜLER-FACCINI, L.; LEITE, J. C. L.; SANSEVERINO, M. T. V.; PERES, R. M. Avaliação de teratógenos na população brasileira. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 7, n. 1, p. 65-71, 2002.

SCHULTE, M.; STRUBE, J. Preparative enantioseparation by simulated moving bed chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 906, p. 399-416, 2001.

SEIDEL-MORGENSTERN, A. Experimental determination of single solute and competitive adsorption isotherms. **Journal of Chromatography A**, v. 1037, p. 255-272, 2004.

SEIDEL-MORGENSTERN, A.; GUIOCHON, G. Modeling of the competitive isotherms and the chromatographic separation of two enantiomers. **Chemical Engineering Science**, v. 48, n. 5, p. 2787-2797, 1993.

SEWELL, P. A.; CLARKE, B.; KEALEY, D. **Chromatographic separations**. London: John Wiley & Sons, United Kingdom, 1988. 356 p.

SILVA, V. M. T.; MINCEVA, M.; RODRIGUES, A. E. Novel analytical solution for a simulated moving bed in the presence of mass-transfer resistance. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 43, p. 4494-4502, 2004.

SILVA JR, I. J.; SANTOS, A. G.; VEREDAS, V.; SANTANA, C. C. Experimental determination of chromatographic separation parameters of ketamine enantiomers on MCTA. **Separation and Purification Technology**, v. 43, p. 103-110, 2005.

SKOGSBERG, U. **Some new strategies in chiral stationary phase development**. 2001. Thesis (PhD) – Goteborg University, Sweden.

SMITH, J. H. **Chromatographic properties of silica-based monolithic HPLC columns**. 2002. Thesis (PhD) – Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J. **Introduction to modern liquid chromatography**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1979. 863 p.

SOUNESS, J. E.; ALDOUS, D.; SARGENT, C. Immunosuppressive and anti-inflammatory effects of cyclic AMP phosphodiesterase (PDE) type 4 inhibitors. **Immunopharmacology**, v. 47, p. 127-162, 2000.

SOUNESS, J. E.; SCOTT, L. C. Stereospecificity of rolipram actions on eosinophil cyclic AMP-specific phosphodiesterase. **Biochemical Journal**, v. 291, p. 389-395, 1993.

SUBRA, P.; VEGA-BANCEL, A.; REVERCHON, E. Breakthrough curves and adsorption isotherms of terpene mixtures in supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 12, p. 43-57, 1998.

TEIXEIRA, M. M.; GRISTWOOD, R. W.; COOPER, N.; HELLEWELL, P. G. Phosphodiesterase (PDE) 4 inhibitors: anti-inflammatory drugs of the future? **Tade and Industrial Policy Strategies**, v. 18, p. 164-170, 1997.

TONDEUR, D.; KABIR, H.; LUO, L. A.; GRANGER, J. Multicomponent adsorption equilibria from impulse response chromatography. **Chemical Engineering Science**, v. 51, p. 3781-3799, 1996.

VIEIRA, R. C.; BISCAIA JR, E. C. An overview of initialization approaches for differential-algebraic equations. **Latin American Applied Research**, v. 30, p. 303-313, 2000.

WANG, X.; CHING, C. B. Kinetic and equilibrium study of the separation of three chiral center drug, nadolol, by HPLC on a novel perphenyl carbamoylated β -cyclodextrin bonded chiral stationary phase. **Separation Science Technology**, v. 37, p. 2567-2586, 2002.

WENG, W.; WANG, Q. H.; YAO, B. X.; ZENG, Q. L. Enantioseparation of amino acid derivatives on an immobilized network polymer derived from L-tartaric acid. **Journal of Chromatography A**, v. 1042, p. 81-87, 2004.

YAMASHITA, N.; YAMAUCHI, M.; BABA, J.; SAWA, A. Phosphodiesterase type 4 that regulates *cAMP* level in cortical neurons shows high sensitivity to rolipram. **European Journal of Pharmacology**, v. 337, p. 95-102, 1997.

ZENONI, G.; PEDEFERRI, M.; MAZZOTTI, M.; MORBIDELLI, M. On-line monitoring of enantiomer concentration in chiral simulated moving bed chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 888, p. 73-83, 2000.

ZHANG, Z.; MAZZOTTI, M.; MORBIDELLI, M. Continuous chromatographic processes with a small number of columns: comparison of simulated moving bed with Varicol, PowerFeed and ModiCon. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 21, p. 454-464, 2004.

ZHOU, D.; CHERRAK, D. E.; KACZMARSKI, K; CAVAZZINI, A; GUIOCHON, G. Prediction of the band profiles of the mixtures of the 1-indanol enantiomers from data acquired with the single racemic mixture. **Chemical Engineering Science**, v. 58, p. 3257-3272, 2003.